



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO**

Dottorato in Biomedicina e Neuroscienze, indirizzo Oncobiologia Sperimentale

Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

## **RUOLO CITOTOSSICO DEL CANNABINOIDE SINTETICO WIN55,212-2 IN CELLULE DI OSTEOSARCOMA MG63: COINVOLGIMENTO DELLA PROTEINA SPARC**

**IL DOTTORE  
SELENIA SABELLA**

**IL COORDINATORE DELL'INDIRIZZO  
Prof.ssa RENZA VENTO**

**IL TUTOR  
Prof.ssa MICHELA GIULIANO**

**CICLO XXV  
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015**

# INDICE

## *Introduzione*

CANNABINOIDI	5
CANNABINOIDI NELLA TERAPIA FARMACOLOGICA	9
CANNABINOIDI NEL CANCRO	9
OSTEOSARCOMA	14
SPARC: PROTEINA MATRICELLULARE COINVOLTA NELLA TUMORIGENESI	17
STRUTTURA DELLA PROTEINA SPARC	18
FUNZIONI DELLA PROTEINA SPARC	19
SPARC: PROMOTORE O SOPPRESSORE TUMORALE?	22
microRNA: NUOVI REGOLATORI DEL PROCESSO TUMORALE	26
VESCICOLE EXTRACELLULARI	29
<i>Obiettivo della tesi</i>	32

## *Materiali e Metodi*

-Colture cellulari	35
-Saggi di vitalità cellulare	35
-Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	36
-Analisi dell'autofagia	36
-Analisi dei livelli proteici tramite immunoblotting	37
-Saggio di immunoprecipitazione	37
-Esperimenti di trasfezione	38
-Valutazione di GRP78 di superficie	39
-RT PCR per SPARC	39
-Real time PCR per la valutazione dell'espressione del miR-29b-1	40
-Liofilizzazione	40
-Purificazione di vescicole extracellulari da terreni di coltura	41
-Saggio del <i>wound healing</i>	41
-Zimografia	42

## *Risultati*

-Valutazione degli effetti del WIN sulla vitalità di cellule MG63	44
-Il trattamento con WIN induce stress del reticolo endoplasmatico e autofagia in cellule MG63	46
-WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL	50
-Studio delle proteine coinvolte nel meccanismo molecolare indotto dal WIN	53
-WIN induce un marcato incremento nei livelli di espressione della proteina SPARC che è responsabile della sensibilizzazione a TRAIL	55

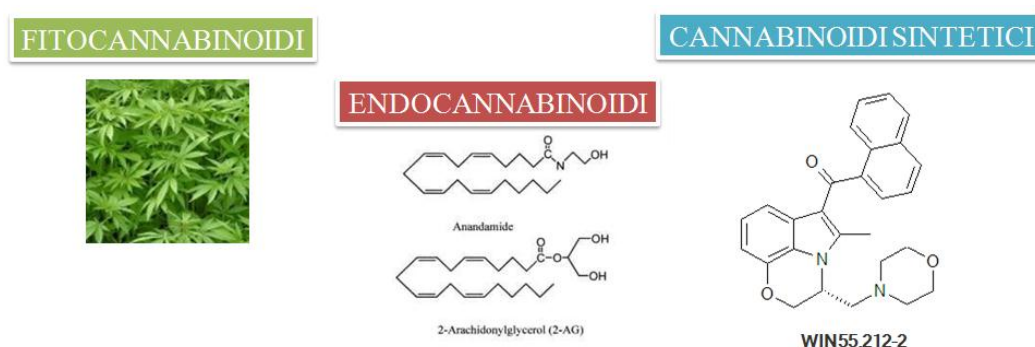
-L'incremento dei livelli di SPARC è correlato all'induzione di ER stress e autofagia dipendenti da WIN	58
-L'interazione SPARC/caspasi-8 media il pathway apoptotico estrinseco	59
-Il WIN modula anche i livelli extracellulari di SPARC	60
-Il WIN modula le capacità migratorie delle cellule MG63	63
-Le vescicole modulano la migrazione	67
-Nelle cellule MG63 SPARC non è un target diretto del miR-29-b1	68
-Il miR-29-b1 media l'inibizione della capacità migratoria indotta dal WIN	69
<i>Discussione</i>	71
<i>Bibliografia</i>	77

## ***Introduzione***

## CANNABINOIDI

I cannabinoidi sono sostanze di origine naturale chimicamente classificati come terpenofenoli. Il termine cannabinoidi si riferiva al gruppo di composti con tipica struttura C21 presenti nella *Cannabis sativa L.* La moderna definizione, basata con maggiore enfasi sulla chimica sintetica e sulla farmacologia, comprende molecole con struttura affine e ogni altro composto capace di interagire con i recettori per i cannabinoidi.

Oggi esistono differenti sottocategorie chimiche che tengono in considerazione le varie forme di composti naturali e sintetici. E' stato proposto di utilizzare il termine **fitocannabinoidi** per i composti naturali vegetali ed **endocannabinoidi** per i composti naturali umani, ligandi endogeni dei recettori per i cannabinoidi (Figura 1). Gli **agonisti sintetici** di tali recettori sono stati classificati in base al loro grado di somiglianza con i fitocannabinoidi.



**Figura 1.** Classificazione dei cannabinoidi.

### Cannabinoidi naturali (fitocannabinoidi)

Con il termine fitocannabinoidi si identifica una famiglia di composti naturali vegetali presenti nella *Cannabis sativa L.* Ad oggi sono stati identificati circa settanta di tali composti, molti dei quali ancora poco studiati. I più importanti sono: tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), il componente principale; il cannabidiolo (CBD); la tetraidrocannabivarina (THCV); il cannabinolo (CBN).

## **Cannabinoidi endogeni**

Con il termine endocannabinoidi si identifica una classe di composti naturali, definiti come ligandi endogeni ad attività cannabinomimetica, che, in seguito all'interazione con specifici recettori, agiscono come messaggeri lipidici. Essi esercitano la loro azione nel controllo del movimento e della percezione, nei processi di apprendimento e memoria, ed inoltre hanno anche azione ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria e antidolorifica.

Gli endocannabinoidi più conosciuti sono: anandamide (arachidonoiletanolamina, ANA); arachidonoilglicerolo (2-arachidonoilglicerolo, 2-AG); 2-arachidonilglyceril etere (noladin etere); O-arachidonoil-etanolamina (virodamina).

L'anandamide (arachidonoiletanolamide, ANA) è stato il primo cannabinoide endogeno isolato dal cervello di maiale nel 1992 [1]. Il nome deriva dalla parola sanscrita *ananda* "stato di grazia" e *amide* in riferimento alla struttura chimica. Infatti, l'anandamide è l'amide tra l'acido arachidonico e l'etanolamina, due composti ubiquitari delle membrane cellulari animali. L'ANA si comporta come un agonista parziale sia del recettore CB<sub>1</sub> che di CB<sub>2</sub> [2] e come ligando endogeno per i recettori vanilloidi. Viene prodotta dall'idrolisi del fosfolipide N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NarPE) in una via metabolica in cui entra in gioco l'enzima N-arachidonil-fosfatidiletanolamina fosfolipasi di tipo D [3].

In seguito alla sua sintesi, l'anandamide viene rilasciata all'esterno della cellula e può legarsi ai recettori presenti sulle cellule limitrofe o sulla stessa cellula che l'ha prodotta, comportandosi come mediatore paracrino o autocrino. Infine dopo aver svolto la sua funzione biologica, l'anandamide viene ricaptata nelle cellule mediante trasportatori di membrana e subisce un'idrolisi enzimatica catalizzata dall'enzima FAAH (Acido Grasso Ammide Idrolasi) con formazione di acido arachidonico ed etanolamina.

## **Cannabinoidi sintetici**

In seguito alle scoperte e al riconoscimento delle attività farmacologiche dei fitocannabinoidi, l'industria farmaceutica ha prodotto differenti cannabinoidi sintetici, alcuni dei quali, come il dronabinol e il nabilone, sono stati registrati per uso terapeutico e vengono commercializzati in differenti paesi. Questi composti agiscono come agonisti sintetici dei recettori per i cannabinoidi mantenendo le differenti proprietà terapeutiche dei cannabinoidi naturali senza però manifestare alcun effetto psicoattivo [4]. I primi

tentativi di sintesi si sono orientati verso la preparazione di molecole del tutto analoghe al THC. In seguito si è assistito a un'evoluzione delle caratteristiche strutturali delle molecole: si è cercato cioè di individuare quali fossero le regioni nella molecola del THC importanti nell'interazione con il recettore cannabinoidale CB<sub>1</sub> e di riprodurre queste porzioni di molecole in modo analogo su nuove molecole di sintesi, che si discostassero dalla classica struttura triciclica benzopiranic tipica dello scheletro del THC. Quindi si è passato a strutture diverse, come ad esempio agli amminoalchilindoli, di cui il WIN-55,212-2 può considerarsi il capostipite. In tale molecola è possibile riconoscere i tre siti di interazione con il recettore, localizzati nella porzione C-7 all'anello naftalenico, nel gruppo carbonilico e nella catena laterale lipofila che si è dimostrata essere molto importante nella modulazione della potenza di questa classe di cannabinoidi sintetici [5].

Siti di legame per i cannabinoidi sono presenti sulla superficie di molti tipi cellulari del corpo umano. Sono stati identificati due tipi di recettori specifici per i cannabinoidi, indicati come recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>. Il nostro organismo produce diversi endocannabinoidi, derivati degli acidi grassi, che si legano ai recettori per i cannabinoidi attivandoli. E' stato quindi definito "sistema cannabinoidale" il sistema costituito dagli endocannabinoidi e dai loro recettori CB.

L'attivazione dei recettori CB può causare svariati effetti che includono, a seconda del tipo cellulare e dello stato dell'organismo, euforia, ansietà, secchezza delle fauci, rilassamento muscolare, fame e riduzione del dolore, effetti analgesici, antinfiammatori e antitumorali [6].

Inoltre sono stati identificati anche altri recettori capaci di legare i cannabinoidi come il recettore TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid type 1 receptor*), un canale ionico che, quando viene attivato, permette l'ingresso attraverso la membrana di cationi mono e bivalenti (prevalentemente ioni calcio) [7].

E' stato anche dimostrato che i cannabinoidi possono interagire con le cellule attraverso i micro domini di membrana ricchi in colesterolo, denominati *lipid raft* [8].

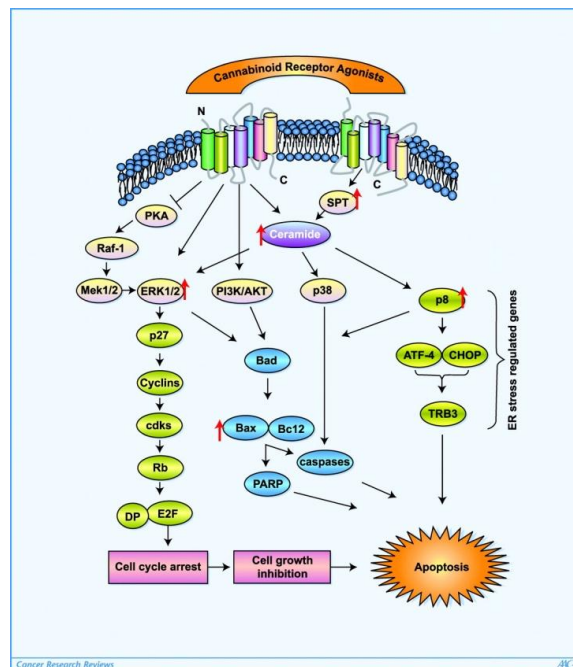
I recettori CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> appartengono all'ampia famiglia dei recettori a 7 eliche transmembrana accoppiati alla proteina G di tipo inibitrice dell'adenilato ciclasi (AC).

L'interazione dei cannabinoidi con questi recettori porta a:

- ✓ inibizione dell'adenilato ciclasi con riduzione degli effetti mediati dal sistema cAMP/PKA;
- ✓ stimolazione delle MAP chinasi (proteine chinasi attivate dai mitogeni);

- ✓ inibizione dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio dipendenti di tipo N e P/Q, mentre effetti opposti si manifestano sui canali del K di tipo A;
- ✓ stimolazione della fosfatidilinositolo 3 chinasi;
- ✓ mobilitazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare.

Inoltre, l'attivazione del recettore  $\text{CB}_1$  determina innalzamento dei livelli intracellulari di ceramide, uno sfingolipide ubiquitario che svolge un importante ruolo nel controllo del destino cellulare (Figura 2). La stimolazione del recettore è seguita da due picchi distinti di ceramide: uno, a breve termine, è associato all'idrolisi della sfingomieline per azione della sfingomielinasi; in tale meccanismo non è coinvolta la proteina G ma una proteina adattatrice detta FAN (*factor associated with Sphingomyelinae activation*); mentre il picco a lungo termine dipende dalla sintesi *de-novo* attraverso la stimolazione della palmitoil-transferasi [9]. La produzione di ceramide è poi seguita dall'attivazione della cascata delle MAP chinasi che porta all'attivazione di ERK, di JNK (che fosforila c-Jun) e del fattore di sopravvivenza cellulare AKT, fattori con un ruolo importante nella regolazione della proliferazione cellulare, nel differenziamento e nella morte cellulare.



**Figura 2.** Differenti pathways di trasduzione del segnale associati all'attivazione dei recettori dei cannabinoidi.



## **CANNABINOIDI NELLA TERAPIA FARMACOLOGICA**

Grazie al DM 18 aprile 2007 due farmaci derivati dalla *cannabis*, il Delta-9-tetraidrocannabinolo ed il Trans-delta-9-tetraidrocannabinolo (Dronabinol) sono stati inseriti nella Tabella II, sezione B delle sostanze stupefacenti e psicotrope. Anche il Nabilone, un farmaco cannabinoide di sintesi, è stato inserito nella stessa tabella.

Tutto ciò rende possibile l'impiego dei cannabinoidi nella terapia farmacologica (terapia del dolore, sclerosi multipla) e crea le basi normative per la loro commercializzazione nel mercato italiano. Dalle pubblicazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) risulta che i cannabinoidi vengono impiegati nel trattamento farmacologico della nausea e del vomito in pazienti affetti da neoplasie o AIDS sottoposti alle cure con farmaci antitumorali e antivirali.

Inoltre si stanno studiando altri usi terapeutici in sperimentazioni cliniche sull'uomo e riguardano il trattamento dell'asma e del glaucoma; si sta anche valutando la loro attività antidepressiva, anticonvulsivante, antispastica e come stimolanti dell'appetito. Negli ultimi anni, infine i cannabinoidi hanno mostrato la loro efficacia nel migliorare la qualità della vita dei malati affetti da sclerosi multipla [10].

## **CANNABINOIDI NEL CANCRO**

Anche se le proprietà antitumorali dei cannabinoidi sono state scoperte per la prima volta più 30 anni fa, quando Munson et al [11] dimostrarono la capacità del THC di inibire la proliferazione cellulare in adenocarcinoma polmonare, la delucidazione dei meccanismi attraverso i quali i cannabinoidi agiscono per bloccare la proliferazione e indurre morte in cellule tumorali sono stati approfonditi solo negli ultimi anni. Per lungo tempo, i cannabinoidi sono stati considerati come farmaci lenitivi ma non curativi della patologia cancerosa. Tuttavia, negli ultimi anni, è stato suggerito un potenziale utilizzo dei cannabinoidi come droghe antitumorali grazie alla loro capacità di contrastare la vitalità e il potenziale invasivo e metastatico in molte tipologie di tumore. In molti modelli tumorali sia *in vitro* che *in vivo*, infatti, l'attivazione del sistema dei cannabinoidi ha indotto arresto del ciclo cellulare, inibizione della sopravvivenza e attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata in seguito alla modulazione di numerosi pathway [12] in cellule tumorali di glioma e linfoma, prostata, mammella e pancreas [13-16]. Inoltre di emergente interesse sono i meccanismi antitumorigenici

innescati dai cannabinoidi nei confronti dei processi di neovascolarizzazione, migrazione cellulare, adesione, invasione e metastasi [17].

Le capacità antitumorali di composti possono essere molto diverse nei vari sistemi tumorali e questo dipende dal meccanismo usato dai cannabinoidi per interagire con le cellule. L'interazione dei cannabinoidi con i diversi tipi di recettori, spesso porta le cellule allo stesso destino, anche se possono essere attivate diverse cascate di segnali intracellulari [18].

### **Pathways indotti dai cannabinoidi**

Lo studio dei mediatori della morte apoptotica indotta dai cannabinoidi, ha permesso di identificare alcune molecole che, più di altre, risultano essere rappresentative della loro azione, come ceramide, specie reattive dell'ossigeno (ROS), chinasi mitogene (MAPK), e alcuni fattori di sopravvivenza.

Una delle prime molecole individuata come effettore dell'azione dei cannabinoidi è stata il ceramide. L'incremento dei suoi livelli può dipendere da sintesi *de novo* o dal rilascio di sfingolipidi dalla membrana in seguito all'attivazione di sfingomielinasi [18]. Nei meccanismi molecolari indotti dai cannabinoidi, l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) occupa un ruolo importante in quanto essi possono esercitare un ruolo cruciale nell'attivazione delle caspasi. Il coinvolgimento dei ROS nell'apoptosi indotta dai cannabinoidi è stato ampiamente dimostrato in cellule di glioma [19] e leucemia [20] e confermato dall'impiego dell' N-acetilcisteina, un tiolo antiossidante che elimina i ROS, o degli inibitori della NAD(P)H ossidasi, che sono in grado di attenuare gli effetti dei cannabinoidi. E' stata inoltre dimostrata una stretta correlazione tra ceramide e ROS. Il ceramide stimola la formazione di ROS e dei meccanismi apoptotici, stabilendo un legame tra il metabolismo degli sfingolipidi e lo stress ossidativo. Inoltre l'inibizione degli enzimi che portano alla formazione dei ROS o il trattamento con antiossidanti determina ridotta attivazione della sfingomielinasi e produzione di ceramide.

Lo studio degli eventi a valle della generazione dei ROS e di ceramide ha evidenziato il coinvolgimento dello stress del reticolo endoplasmatico. In molti modelli sperimentali tumorali elevati livelli di ROS inducono ER stress che, a loro volta, sono responsabili dell'attivazione della via apoptotica intrinseca mitocondriale [21]. Inoltre è stata documentata anche l'attivazione dell'asse p8/CHOP nell'apoptosi indotta dai cannabinoidi [22].

Un altro pathway modulato dai cannabinoidi, è rappresentato dalla cascata delle proteine chinasi attivate dai mitogeni (ERK, JNK e p38/MAPK). Molti dati dimostrano che l'attivazione di queste chinasi è responsabile del controllo della proliferazione e sopravvivenza gestito dai cannabinoidi. E' stato notato, inoltre, come la durata dello stimolo possa essere fondamentale per il differente tipo di risposta cellulare. Ad esempio, l'attivazione transiente della cascata di ERK porta alla sopravvivenza e alla proliferazione, mentre un'attivazione a lungo termine genera una risposta apoptotica in glioma maligno [23] e sarcoma di Kaposi [24].

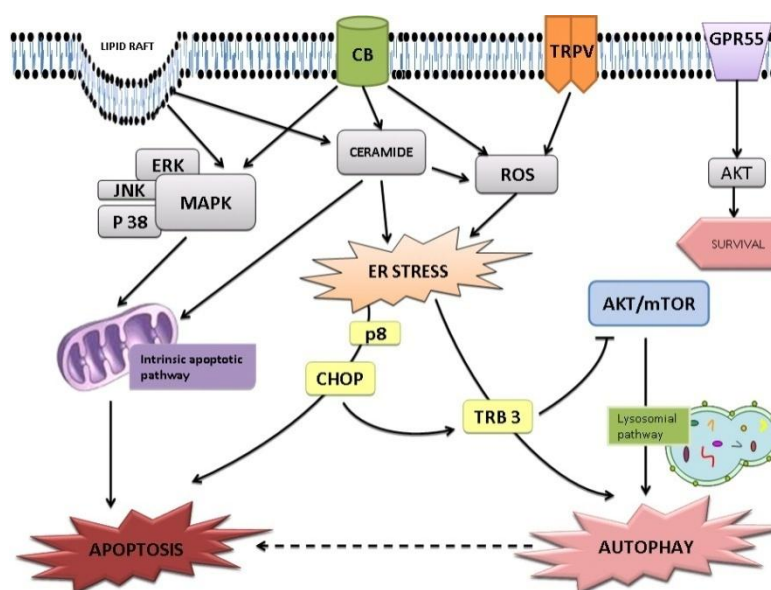
L'attivazione dei pathway di morte deve essere accompagnata dalla riduzione dei livelli dei fattori di sopravvivenza. Una via centrale di segnalazione intracellulare pro-sopravvivenza è rappresentata dal pathway PI3K/AKT, la cui importanza in diversi tumori è anche confermata da numerosi studi clinici. Questa chinasi ha un ruolo centrale nella via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR che attiva processi cruciali come la sopravvivenza cellulare, la crescita, la proliferazione, l'angiogenesi, la migrazione cellulare e l'invasività [25]. Al contrario, l'inibizione di pAKT conduce all'arresto del ciclo cellulare che precede la risposta apoptotica molto spesso mediata dal coinvolgimento della via intrinseca mitocondrio-dipendente. L'inibizione di AKT è coinvolta nell'azione antitumorale dei cannabinoidi. Nelle cellule tumorali gastriche umane è stato visto che gli agonisti dei recettori dei cannabinoidi inducono arresto del ciclo cellulare, conseguente all'inibizione di AKT correlata all'attivazione della via delle MAPK [26].

Studi recenti hanno dimostrato che, in diversi modelli sperimentali di cancro, i cannabinoidi possono agire attivando anche il processo autofagico. L'inibizione farmacologica o genica dell'autofagia è in grado di prevenire l'apoptosi indotta dai cannabinoidi. In più, è stato dimostrato che il blocco dell'apoptosi previene la morte ma non l'autofagia in cellule trattate con i cannabinoidi, suggerendo che l'induzione di autofagia è parte del meccanismo attraverso cui i cannabinoidi agiscono in cellule tumorali sia *in vivo* che *in vitro*. Nelle cellule umane di glioma, il modello principale di cancro per lo studio dell'azione dei cannabinoidi, è stato osservato che il tetraidrocannabinolo induce morte cellulare attraverso la stimolazione dell'autofagia [27]. I dati indicano che il THC induce accumulo di ceramide, fosforilazione di eIF2 $\alpha$  ed ER-stress che attiva l'autofagia attraverso l'inibizione, TRB3-dipendente, dell'asse AKT/mTOR. In queste cellule l'autofagia sembra essere a monte dell'apoptosi nella morte cellulare indotta dai cannabinoidi.

Uno studio condotto *in vivo* su carcinoma epatocellulare ha mostrato che l'inibizione della crescita indotta dal trattamento con THC viene annullata quando l'autofagia è geneticamente o farmacologicamente bloccata. Questo conferma che l'induzione dell'autofagia è, probabilmente, un passo chiave nella morte cellulare indotta dai cannabinoidi [28].

L'interplay tra autofagia e apoptosi che si realizza in seguito al trattamento con i cannabinoidi ha avuto conferma da diverse osservazioni: in cellule di carcinoma mammario trattate con cannabidiolo, l'inibizione della produzione di ROS blocca l'induzione di entrambi i processi e, dall'altra parte l'aumento dei livelli della Beclina-1, marker dell'autofagia, gioca un ruolo centrale anche nell'induzione dell'apoptosi mediata dal cannabidiolo [29].

La Figura 3 riporta un quadro schematico delle principali vie attivate dai cannabinoidi.



**Figura 3. Rappresentazione schematica dei pathway di morte cellulare indotti dai cannabinoidi.**

### Azione sinergica dei cannabinoidi in combinazione con altre droghe

Studi recenti hanno dimostrato la capacità dei cannabinoidi di agire in maniera sinergica con altre molecole per attivare pathway di morte in cellule tumorali. E' ben noto che nella terapia anticancro l'impiego di differenti composti piuttosto che una singola droga rappresenta una strategia terapeutica con differenti vantaggi. Da un lato, la contemporanea attivazione di pathway biochimici differenti può esercitare un effetto

sinergico; dall'altro, l'impiego in combinazione permette di ridurre le dosi di ogni singolo composto al fine di ridurre gli effetti collaterali.

In cellule pancreatiche la combinazione dei cannabinoidi con la gemcitabina induce effetti sinergici via attivazione del pathway autofagico. In questo modello la gemcitabina induce overespressione del recettore CB sensibilizzando le cellule all'effetto dei cannabinoidi. Un ruolo centrale in questo pathway è giocato dall'incrementata produzione di ROS e dall'induzione di ER stress che portano a morte cellulare di tipo II [30].

Un altro esempio di azione sinergica è stato riportato da Gustafsson et al [31] i quali hanno dimostrato che il cannabinoide sintetico HU210, anandamide e altri derivati hanno effetti citotossici e antiproliferativi quando combinati con 5-fluorouracile (5-FU) in cellule di carcinoma coloretale. Gli autori dimostrano che il meccanismo attivato sembra essere indipendente dai recettori CB e suggeriscono il coinvolgimento di ER stress in quanto l'impiego di comuni antiossidanti attenua l'effetto dei cannabinoidi.

## OSTEOSARCOMA

L'osteosarcoma (OS) è un tumore maligno primitivo dell'osso che colpisce più spesso soggetti di sesso maschile con due picchi di incidenza: tra i 10 e i 40 anni e negli anziani. Le sedi più frequenti sono le metafisi delle ossa lunghe, soprattutto attorno al ginocchio: il femore, specie in zona diafisaria distale e la metafisi prossimale della tibia, e l'omero prossimale. Si manifesta con dolore intenso, tumefazione, cute calda, spesso con evidente reticolo venoso.

L'osteosarcoma è un tumore maligno primitivo dell'osso ad istogenesi mesenchimale caratterizzato dalla produzione di matrice osteoide ed ossea. Si possono identificare diversi sottotipi, in funzione delle caratteristiche cliniche, radiografiche e microscopiche; alcuni di questi sottotipi hanno rilevanza prognostica. Gli OS possono essere così classificati: OS classico intramidollare o centrale (osteo-, condro- o fibroblastico); OS teleangectasico; OS centrale a basso grado di malignità; OS della superficie (parostale, periosteale, di superficie ad alto grado); OS su malattia di Paget; OS secondario a lesioni preesistenti; OS della mandibola; OS in condrosarcoma dedifferenziato; OS multicentrico; OS post-irradiazione. Il tumore osseo può essere locale, metastatico o recidivante.

La correlazione tra l'età adolescenziale e la comparsa del tumore, nella maggior parte dei pazienti, in coincidenza con il periodo di massimo accrescimento osseo, individuano nell'aumentata attività osteoblastica ed osteogenetica un fattore predisponente all'insorgenza della neoplasia [32]. L'unica relazione certa di causa-effetto esiste per l'esposizione a radiazioni. L'altro fattore per il quale è stato accertato un sicuro coinvolgimento nell'insorgenza dell'osteosarcoma sono le anomalie genetiche (mutazioni e/o delezioni) a carico di geni oncosoppressori p53 e RB1, responsabili anche della comparsa di altri tipi di cancro [33]. Infatti, nei pazienti affetti da OS, mutazioni o delezione parziale o completa del gene P53 sono stati rilevati in circa il 30-50% dei casi, indicando come queste alterazioni genetiche giochino un ruolo di primo piano nella tumorigenesi di questa neoplasia. Inoltre, mutazioni del gene P53 sono state associate anche ad una sindrome particolare, la sindrome di Li-Fraumeni, la quale è caratterizzata da un'elevata incidenza di diversi tumori, fra cui anche l'OS.

Altro fattore genetico predisponente all'insorgenza di OS è la delezione del gene oncosoppressore del retinoblastoma (gene RB1), localizzato nella regione cromosomica 13q14. La perdita parziale o completa del gene RB1 è responsabile dell'insorgenza di retinoblastoma, un raro tumore della retina che insorge in età infantile. E' stato

ampiamente dimostrato che i pazienti affetti da retinoblastoma ereditario, in cui entrambi gli alleli del gene RB1 risultano alterati, presentano un rischio di sviluppare OS in età adolescenziale di circa 500 volte maggiore di quello presente nella popolazione normale. Inoltre, la delezione completa o parziale del gene RB1 è stata ritrovata in circa il 60% degli OS, confermando ulteriormente come questa anomalia genetica sia il fattore predisponente all'insorgenza non solo del retinoblastoma, ma anche di buona parte degli OS. Nella genesi di osteosarcomi non ereditari sono anche state chiamate in causa anomalie dei geni che regolano il ciclo cellulare come CDK4, p16, INK4a, CICLINA D e MDM2 [34].

Le prime indicazioni sull'impiego di chemioterapia in pazienti con OS risalgono a 30 anni fa e attualmente vi è pieno consenso nel considerare l'associazione di chirurgia e chemioterapia come procedura standard nel trattamento dell'OS ad alto grado. Tuttavia vi sono ancora numerosissime problematiche aperte che riguardano in particolare l'identificazione del trattamento chemioterapico standard. La carenza di adeguate evidenze relativamente a questi aspetti è la conseguenza di problemi di carattere metodologico derivanti dalla rarità della malattia, dalle sue numerose varianti anatomiche e dalle diverse modalità di presentazione per stadio di malattia e per età della popolazione coinvolta. In particolare, a causa della rarità della malattia, buona parte dei dati disponibili sono frutto prevalentemente di studi clinici non controllati, mentre pochi sono gli studi clinici controllati randomizzati riportati in letteratura. Un altro problema, non secondario nella valutazione del ruolo della chemioterapia nell'OS, deriva dal fatto che larga parte dei dati disponibili in letteratura si riferiscono a casistiche selezionate per età (età massima 40 anni), presentazione anatomico-clinica e stadiazione, con forme primitive di OS ad alto grado, senza metastasi evidenti alla diagnosi.

Nella maggior parte di casi l'osteosarcoma viene trattato con uno o più cicli di chemioterapia prima dell'intervento chirurgico (chemioterapia neoadiuvante) per ridurre le dimensioni del tumore, seguita da altri cicli effettuati dopo l'operazione (chemioterapia adiuvante) allo scopo di eliminare eventuali cellule malate sfuggite al bisturi. A questi due approcci terapeutici si associa eventualmente la radioterapia. Sono oggi in fase di studio anche nuove terapie per combattere l'osteosarcoma. Tra queste è possibile ricordare gli anticorpi monoclonali, farmaci capaci di indirizzare il sistema immunitario del paziente contro le cellule tumorali e bifosfonati, già ampiamente utilizzati per curare l'osteoporosi.

I trials clinici attualmente disponibili sono due: PROTOCOLLO: ISG/OS-2 (trattamento con MEPACT© integrato dall' uso di alte dosi di ifosfamide in caso di scarsa risposta istologica alla chemioterapia primaria con metotrexato, cisplatino e adriamicina) e PROTOCOLLO: EUROBOSS (combinazione di 3 farmaci, adriamicina, cisplatino e ifosfamide). Entrambi vengono applicati a pazienti con malattia localizzata, nel primo caso con età inferiore ai 40 anni, mentre nel secondo con età superiore ai 40 anni. Nuove varianti terapeutiche potrebbero risultare quindi molto interessanti.



## **SPARC: PROTEINA MATRICELLULARE COINVOLTA NELLA TUMORIGENESI**

E' noto che la matrice extracellulare (ECM) svolge un ruolo fondamentale nella patologia tumorale, in particolare in quelle forme tumorali che colpiscono tessuti in cui essa è molto rappresentata come il tessuto osseo.

Anche se la funzione primaria della matrice extracellulare è quella di mantenere la forma del tessuto agendo da supporto strutturale, numerosi studi attestano che essa non è solo uno spettatore passivo; la matrice, infatti, interagisce direttamente con le cellule circostanti attraverso una famiglia di recettori di superficie noti come integrine. Il pathway di segnale delle integrine interagisce anche con quello dei recettori per i fattori di crescita per controllare eventi intracellulari che, in definitiva, contribuiscono alla regolazione della proliferazione cellulare [35,36].

Fare luce sull'interazione delle cellule cancerose con il loro microambiente è pertanto una tappa essenziale per identificare i pathways che controllano la trasformazione cellulare, la crescita del tumore primario, il processo metastatico e la risposta terapeutica. Ad ogni stadio della progressione tumorale, le cellule cancerose comunicano e ricevono segnali dal microambiente, composto da cellule tumorali, matrice extracellulare, cellule stromali, microvasi e cellule del sistema immunitario [37]. La deposizione e il rimodellamento dell'ECM sono regolati da una famiglia di proteine extracellulari conosciute come “**proteine matricellulari**” che, attraverso la loro capacità di funzionare come adattatori tra la matrice extracellulare e la superficie cellulare, possono controllare il destino delle cellule [38,39].

La proteina SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) nota anche come osteonectina o BM-40 è una glicoproteina secreta multifunzionale di 43 kDa, che appartiene alla famiglia delle proteine matricellulari. Essa è stata inizialmente descritta come il maggiore costituente non collagenoso dell'osso bovino e umano, poi come proteina secreta dalle cellule in proliferazione, in seguito è stata anche definita come una proteina prodotta da colture di fibroblasti [40]. Conosciuta come membro della famiglia delle proteine matricellulari insieme alle trombospondine 1 e 2, alle tenascine C e X e all'osteopontina, SPARC non contribuisce direttamente alla formazione degli elementi strutturali della matrice extracellulare, ma modula i contatti cellula-cellula e cellula-matrice e interagisce con i recettori di superficie, con i fattori di crescita e con le proteasi [41].

Visto il loro coinvolgimento nella perdita di adesione e nel processo migratorio, le proteine matricellulari giocano un ruolo cruciale nelle patologie. SPARC, in modo particolare, sembra essere coinvolta nelle malattie metaboliche quali diabete ed obesità [42]. Inoltre negli ultimi anni è emerso anche un coinvolgimento dei membri della famiglia delle trombospondine, tenascine e SPARC nella formazione e maturazione della sinapsi e nel dolore cronico neuropatico [43].

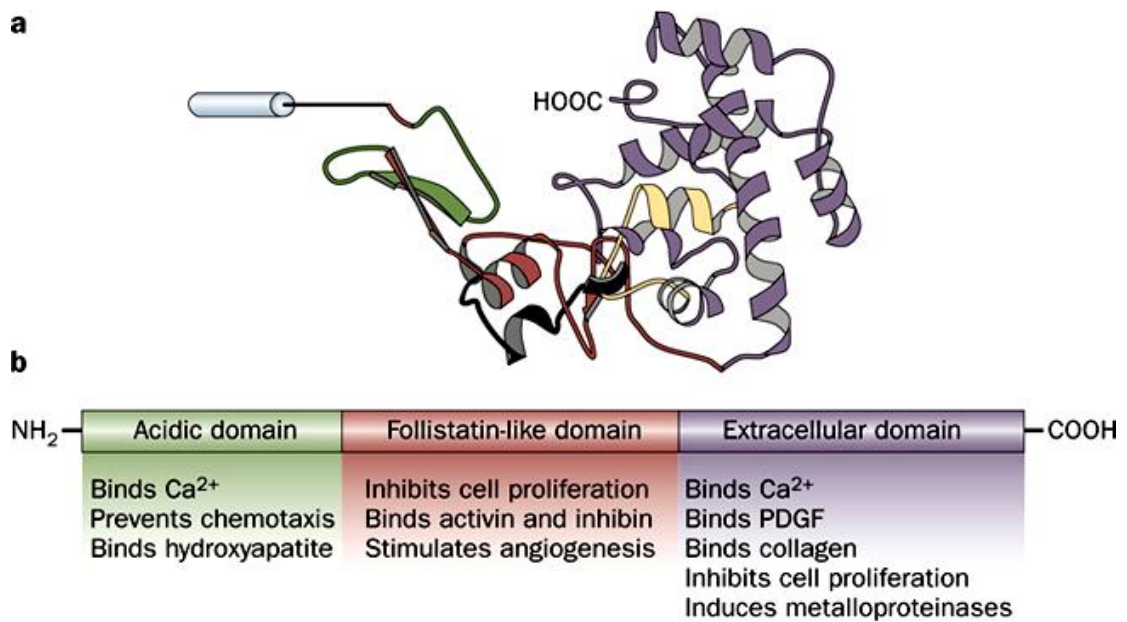
## **STRUTTURA DELLA PROTEINA SPARC**

SPARC è codificata da un gene molto conservato posto sul cromosoma 5 (5q 31-33) che presenta, nell'uomo, 10 esoni. Il gene codifica per una proteina il cui peso molecolare è di 43 kDa. Inizialmente la proteina è formata da 303 residui amminioacidici. Prima che la proteina venga secreta, la sua sequenza segnale di 17 amminioacidi viene rimossa e alla fine la proteina risulterà costituita da 286 amminioacidi.

Dal punto di vista strutturale, SPARC è una proteina modulare che presenta tre principali domini strutturali a cui sono associate le differenti funzioni (Figura 4) [42,44]:

- il dominio terminale NH<sub>2</sub> lega ioni Ca<sup>2+</sup> con bassa affinità e media il legame con l'idrossiapatite. E' implicato nella mineralizzazione della cartilagine e dell'osso. Contiene il più grande epitopo immunologico e una sequenza di questo modulo è coinvolta nei processi di perdita di adesione, inibizione della migrazione e influenza l'espressione delle proteine dell'ECM.
- il dominio "follistatina-simile" ricco in cisteina. E' una struttura allungata non globulare costituita da due porzioni legate da ponti disolfuro. Presenta due siti di legame per il rame uno dei quali stimola proliferazione cellulare e angiogenesi.
- il dominio carbossi-terminale presenta l'elica E e l'elica F e contiene una sequenza che inibisce la proliferazione, la migrazione e causa perdita di adesione e modifiche a livello della forma delle cellule.

Dopo la secrezione SPARC va incontro a proteolisi da parte di metalloproteasi di matrice.



**Figura 4. Rappresentazione dei domini funzionali di SPARC**

## FUNZIONI DELLA PROTEINA SPARC

Gli studi hanno dimostrato differenti ruoli di SPARC in rapporto alla sua localizzazione intra- o extra- cellulare.

### Funzioni di SPARC extracellulare

L'osservazione che SPARC sia una proteina molto conservata in organismi diversi sul piano evolutivo (Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, zebrafish, pollo, topo e uomo) suggerisce che essa possa svolgere una funzione basilare nella biologia della matrice extracellulare. Le sono state ascritte, infatti, molte funzioni incluso il coinvolgimento nel rimodellamento tissutale, nella morfogenesi e nella mineralizzazione dell'osso. Studi in vitro usando colture primarie hanno dimostrato l'abilità di SPARC di modulare la diffusione delle cellule e l'adesione.

Durante lo sviluppo e il differenziamento tissutale l'espressione di SPARC è alta e si mantiene tale anche nei tessuti sottoposti ad alto turnover dell'ECM, come nel caso del tessuto osseo. SPARC è espressa ad alti livelli nella matrice ossea vista la sua alta affinità per il collagene e per l'idrossiapatite [45]. Quando SPARC è legata alla forma insolubile del collagene di tipo I, vi si legano anche cristalli sintetici di apatite e ioni Ca<sup>2+</sup> e viene così avviata la mineralizzazione del tessuto scheletrico [46]. Recenti studi hanno dimostrato la sua presenza anche in tessuti o organi non mineralizzati come

midollo osseo, linfonodi, cervello, colon, fegato, pancreas, tiroide, ovaio, utero, prostata.

La partecipazione di SPARC nell'assemblaggio dell'ECM e nel suo turnover è relata alla capacità di legare componenti della membrana basale, come il collagene IV e il collagene fibrillare I, III, e V, influenzandone la secrezione, deposizione ed assemblaggio [46]. Inoltre, essa regola la secrezione e l'attivazione di metalloproteasi (MMPs).

Numerosi studi indicano che SPARC regola il segnale delle integrine e la loro abilità di interagire con i componenti strutturali dell'ECM. Ad esempio SPARC influenza i componenti a valle del segnale delle integrine agendo come scaffold extracellulare per l'attivazione delle ILK (integrin linked kinase), e regolando la soglia di attivazione dei segnali delle integrine e dei fattori di crescita [47,48].

Un'importante proprietà di SPARC è quella di indurre cambiamenti a livello della forma delle cellule e di regolare la perdita di adesione. Tutto ciò è in grado di influenzare la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi in maniera diversa a seconda della linea cellulare che si analizza.

SPARC esogeno, per esempio, è in grado di indurre arrotondamento delle cellule e quindi di modificare la morfologia delle cellule endoteliali, dei fibroblasti e delle cellule del muscolo liscio. Anche l'interazione con il collagene di tipo III, V e con la trombospondina, sembra essere importante al fine di determinare tali modifiche morfologiche [46].

L'incremento di SPARC, stimolando la perdita delle adesioni cellulari, crea le condizioni ideali per la transizione delle cellule dallo stato fortemente adesivo a quello intermedio con la perdita dei legami tra il citoscheletro e la matrice extracellulare, determinando, così, una maggiore tendenza alla mitogenesi e alla motilità.

Il ruolo di SPARC nella migrazione cellulare sembrerebbe essere cellulo-specifico, infatti, la presenza di SPARC esogeno è richiesta per la migrazione dei fibroblasti ma non per quella dei cheratinociti mentre la sua assenza incrementa la migrazione dei leucociti [49].

L'interazione tra SPARC e il collagene dimostra che SPARC è coinvolta nel rimodellamento dell'ECM. Particolare attenzione è stata rivolta all'interazione tra SPARC e il collagene di tipo I che regola rispettivamente la perdita di adesione e invasività cellulare e a quella tra SPARC e collagene IV che modula la corretta formazione della lamina basale [50].

E' stato dimostrato che SPARC può interagire con VEGF e impedire il suo legame con cellule endoteliali umane bloccandone la proliferazione. L'interazione tra SPARC e questo fattore conferma il coinvolgimento della proteina nel processo dell'angiogenesi. Con il termine angiogenesi si fa riferimento allo sviluppo di nuovi vasi a partire dal sistema vascolare preesistente. E' stato visto che l'espressione di SPARC è correlata spazialmente e temporalmente alla formazione di nuovi vasi in vari tessuti. E' espressa in particolare nei capillari nascenti nel corso di un periodo di rapida angiogenesi nel cervello allo stadio embrionale e nella guarigione delle ferite del derma. L'attività di angiogenesi sembrerebbe essere correlata alla presenza di rame che si accumulerebbe prima del processo di vascolarizzazione. Inoltre, l'aggiunta di SPARC esogeno a colture di cellule endoteliali, contribuisce all'incremento di strutture simili ai capillari. Come per la proliferazione e la migrazione, SPARC sembra avere un duplice ruolo anche nell'angiogenesi, da una parte è in grado di contribuire alla formazione di nuovi vasi, dall'altra potrebbe interferire negativamente con tale fenomeno [51].

### **Funzioni di SPARC intracellulare**

E' stata dimostrata, sia *in vivo* che *in vitro*, la presenza di SPARC anche all'interno del nucleo e a livello del citoplasma durante la metafase e l'anafase. Inoltre, la sua presenza in cellule embrionali in proliferazione indica un probabile ruolo di SPARC nella regolazione della mitosi durante lo sviluppo. SPARC infatti, in alcuni modelli sperimentali, agisce come potente inibitore del ciclo cellulare, essendo in grado di bloccare le cellule rallentando il ciclo cellulare stesso [52].

Sebbene i dati riportati in letteratura non siano molti, sembrerebbe esistere una relazione tra l'espressione di SPARC e l'induzione di stress del reticolo endoplasmatico e autofagia, percorsi cellulari che, molto spesso, si associano all'induzione di morte di tipo apoptotico.

In cellule di tumore neuroectodermico primitivo è stato evidenziato come l'elevata espressione della proteina SPARC sembra inibire la proliferazione cellulare, la migrazione e l'angiogenesi e indurre autofagia seguita da morte cellulare per apoptosi [53]. Anche se il ruolo di SPARC come soppressore tumorale dipende dal fenotipo cellulare e dal microambiente circostante, e nonostante il meccanismo molecolare coinvolto non sia ancora del tutto chiaro, gli elevati livelli di SPARC in combinazione al trattamento chemioterapico, risulterebbero un valido percorso nell'induzione di

apoptosi in cellule di neuroblastoma. L'azione sinergica tra la presenza di SPARC e la radioterapia agirebbe sull'attivazione della caspasi-3, sul clivaggio del suo target PARP e anche sull'attivazione dello stress del reticolo endoplasmatico attraverso PERK, IRE1α e GRP78/Bip. SPARC sembrerebbe essere a monte dell'induzione di ER stress e autofagia. Poiché all'interno del reticolo endoplasmatico si realizza il ripiegamento delle proteine e le modifiche post traduzionali necessarie affinché queste possano svolgere le loro funzioni, diverse condizioni di stress potrebbero determinare una perdita dell'omeostasi reticolare, causando la condizione di ER stress, che culmina nell'UPR (*Unfolded Protein Response*) e nell'attivazione di apoptosi. In seguito all'overespressione di SPARC, infatti, è stato evidenziato come questi percorsi molecolari siano attivati e contribuiscano all'induzione di CHOP, target ultimo dell'UPR, che attiva l'apoptosi [54].

Dati bibliografici riportano inoltre che la proteina SPARC può essere direttamente responsabile dell'induzione di morte apoptotica grazie alla sua capacità di interagire con la caspasi-8 e di mediarne la sua attivazione portandola a ridosso dei recettori di morte. In alcune linee cellulari di cancro al colon-retto, le cellule neoplastiche esprimono bassi livelli di SPARC e la promozione dell'apoptosi indotta da SPARC sembra procedere attraverso l'attivazione del pathway estrinseco, associata ad un'incrementata espressione genica di caspasi-8 [55].

## **SPARC: PROMOTORE O SOPPRESSORE TUMORALE?**

Grazie alla sua capacità di dirigere la deposizione della matrice, l'interazione cellula-matrice ed i segnali dei fattori di crescita, SPARC è anche implicata in differenti fasi della progressione tumorale, in particolare nella migrazione, nell'angiogenesi, nella proliferazione e nella sopravvivenza, sebbene la sua capacità di promuovere o di inibire la progressione tumorale dipenda dalla linea cellulare, dallo stadio del tumore e dal suo microambiente [56].

Numerosi sono gli studi che dimostrano l'alterata espressione di SPARC in differenti forme tumorali, tuttavia i dati pubblicati sulla funzione di SPARC durante la tumorigenesi sono spesso contraddittori anche all'interno dello stesso tipo tumorale.

La funzione di SPARC nei tumori risulta, dunque, essere multidimensionale: agisce non solo come promotore ma anche come soppressore tumorale. Nei tumori altamente metastatici come glioma, melanoma, cancro al seno, tumore gastrico [57-60] risulta essere molto espressa promuovendo metastasi alle ossa e transizione epitelio-

mesenchima, al contrario, nel cancro alle ovaie, al colon retto e al pancreas e nel glioblastoma agisce come fattore antitumorale inibendo la proliferazione, bloccando l'angiogenesi, il ciclo cellulare e inducendo apoptosi [61-64].

### **SPARC come promotore tumorale**

Alti livelli di SPARC sono stati osservati nel glioma umano, in cui sono associati ad un fenotipo invasivo. Le cellule che iperesprimono SPARC mostrano decremento dell'attività delle caspasi-3 e -7. Inoltre SPARC esogeno rapidamente induce fosforilazione di AKT, e questo pathway pro-sopravvivenza mediato dall'asse AKT/PI3K, sembra contribuire alla malignità del tumore. Sembra, quindi, che l'attivazione di AKT sia essenziale per gli effetti anti apoptotici di SPARC, suggerendo che possa promuovere la progressione tumorale rendendo le cellule capaci di sopravvivere sotto condizioni di stress come la deprivazione di siero [57].

Anche in altre linee cellulari SPARC si comporta da promotore tumorale. In uno studio condotto in cellule di melanoma, l'iperespressione di SPARC è associata ad incremento di aggressività e ad una peggior prognosi, mentre il suo silenziamento, mediante l'utilizzo di uno specifico siRNA, induce inibizione della crescita cellulare con arresto delle cellule in fase G1 del ciclo proliferativo e accumulo di p21, un inibitore della chinasi ciclina-dipendente della fase G1. L'impiego di un terreno di coltura condizionato contenente SPARC non ristabilisce la crescita in queste cellule in cui si è silenziato SPARC, suggerendo, così, che sono coinvolti nella proliferazione i livelli intracellulari di SPARC, e non quelli della proteina secreta. Questi studi suggeriscono che SPARC possa contribuire alla crescita cellulare e possa essere un potenziale target molecolare per la terapia del melanoma [58].

Un altro esempio dell'attività di promotore tumorale di SPARC lo si ritrova in cellule di cancro gastrico in cui l'iperespressione di SPARC è associata a proliferazione e incremento dell'invasività, mentre la sua inibizione riduce le capacità invasive [60].

### **SPARC come soppressore tumorale**

Al contrario, invece, in altri tipi di cancro sono stati osservati bassi livelli di espressione di SPARC, e queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare un suo ruolo inibitorio per la formazione del tumore. Una delle prime indicazioni di SPARC come soppressore della morte si è avuta dai risultati ottenuti in cellule di cancro ovarico. SPARC è

espresso nelle normali cellule epiteliali ovariche, ma risulta assente o espresso a basse concentrazioni nell'80% delle linee cellulari neoplastiche ovariche; inoltre, il 90% di queste cellule cancerose presentano ipermetilazione del promotore del gene di SPARC. Inoltre, i livelli di espressione di questa proteina sono inversamente correlate con la malignità del cancro ovarico; infatti, un trattamento esogeno con SPARC inibisce la proliferazione di queste cellule inducendo morte apoptotica caspasi-3 dipendente [61].

Anche in linee cellulari di cancro al colon-retto, le cellule neoplastiche esprimono bassi livelli di SPARC causati dall'elevata metilazione del suo promotore, che sono associati a resistenza nei confronti di trattamenti chemioterapici. L'iperespressione di SPARC, indotta dal trattamento delle cellule con agenti demetilanti (5-aza-2' deossicitidina), incrementa la sensibilità ai chemioterapici riducendo la vitalità cellulare e portando a morte le cellule. La promozione dell'apoptosi indotta da SPARC sembra procedere attraverso l'attivazione del pathway estrinseco, associata ad un'incrementata espressione genica di caspasi-8, caspasi-10 e FADD [62].

Nel cancro pancreatico la riduzione dei livelli di SPARC è associata con minore deposizione di matrice extracellulare e riduzione della morte apoptotica [63].

E' stato di recente dimostrato in cellule di glioblastoma il coinvolgimento di SPARC nel meccanismo angiogenetico. SPARC è capace di legare il fattore di crescita VEGF impedendone il legame con il recettore presente sulla membrana delle cellule dell'endotelio microvascolare. È stata proposta quindi una funzione di SPARC come regolatore negativo dell'angiogenesi. In questo caso un'aumentata espressione di SPARC determina una diminuzione dei livelli di espressione del mRNA codificante per il VEGF [64].

Sicuramente molto interessante è uno studio abbastanza recente che vede SPARC come promotore dell'autofagia, seguita da apoptosi, in cellule di tumore neuroectodermico primitivo (PNETs). In questo modello sperimentale l'induzione di autofagia da parte di SPARC è morfologicamente dimostrata dalla formazione di vacuoli autofagici, da un incremento dei livelli di espressione della proteina LC3 e dall'induzione dell'enzima lisosomale catepsina B che induce il rilascio del citocromo C dal mitocondrio con conseguente attivazione della caspasi-3, evento che porta la cellula verso una morte cellulare programmata di tipo I [53].

Il ruolo di SPARC nel modulare così tanti eventi cellulari, e il suo contraddittorio coinvolgimento nella tumorigenesi, hanno indotto molti ricercatori a pensare che fare



chiarezza sul ruolo di questa proteina possa essere utile per intervenire e controllare la crescita tumorale e la metastasi, contribuendo così ad un miglioramento delle strategie terapeutiche.

## **microRNA: NUOVI REGOLATORI DEL PROCESSO TUMORALE**

I miRNA sono piccole molecole endogene di RNA non codificante, lunghe circa 22 nucleotidi, molto conservati tra le specie. Essi possono essere considerati regolatori dell'espressione genica in quanto agiscono come repressori a livello post-trascrizionale legandosi alla regione 3' UTR del mRNA target. Questo gruppo di piccoli RNA regolatori è stato scoperto negli anni 90 [65], e ad oggi sono stati identificati oltre 1000 differenti miRNA. Oltre il 60% dei geni umani codificanti proteine presentano dei siti predittivi di legame ai miRNA [66]. La biogenesi dei miRNA inizia nel nucleo dove vengono trascritti dall'RNA polimerasi II come lunghi trascritti primari (pri-miRNA) [67]. I pri-miRNAs sono poi processati dall' RNase III Drosha e da DGCR8/Pasha, così si formano delle molecole chiamate precursori dei miRNA (pre-miRNAs) di ~70 nucleotidi con struttura stem-loop [68]. I pre-miRNAs sono poi trasportati fuori dal nucleo nel citoplasma dall'esportina-5 e quindi vengono processati dall'RNase III Dicer in molecole di ~22 nt, i miRNA duplex [69,70]. Nei mammiferi il Dicer interagisce con le proteine Ago1-Ago4 le quali assemblandosi con il miRNA maturo formano il complesso RISC (microRNA-induced silencing Complex) che a questo punto è pronto per legare il messaggero target al fine di reprimere la sua traduzione o degradarlo [71].

Questi piccoli regolatori genici giocano un ruolo in differenti processi biologici come lo sviluppo, l'omeostasi, il metabolismo, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'angiogenesi. Inoltre un'espressione anormale dei miRNA può esitare cambiamenti nella regolazione post-trascrizionale dei mRNA, rendendosi così responsabili dell'insorgere di differenti patologie come ad esempio il cancro [72,73]. L'importante ruolo dei miRNA sia nei processi fisiologici che in quelli patologici fa sì che questi possano essere oggi considerati dei potenziali target terapeutici nella cura di molte patologie tra le quali quella tumorale.

Molti studi hanno mostrato che i miRNA risultano regolati in maniera aberrante in differenti tipologie di tumori umani e ciò suggerisce un nuovo ruolo come promotori o soppressori tumorali. I profili di espressione dei miRNA possono essere variamente differenti a seconda della tipologia di tumore, differiscono tra la cellula o il tessuto tumorale e la loro controparte normale così come a seconda dello stadio di sviluppo del tumore stesso. Inoltre a prescindere dalle previsioni di legame alla regione 3' UTR di un determinato mRNA che fa sì che ciascun miRNA possa avere un certo numero di target putativi, questi stessi possono variare da un citotipo tumorale ad un altro [74].

Nel caso specifico dell'osteosarcoma recenti studi hanno individuato la presenza di molti miRNA deregolati comparando le cellule di osteosarcoma a quelle del tessuto osseo normale, agli osteoblasti o alle cellule staminali mesenchimali. I profili di espressione di determinati e selezionati miRNA sono stati confermati anche in campioni di pazienti affetti da osteosarcoma, divenendo così oggi di primaria importanza nel delineare il complesso meccanismo genetico che sta alla base dello sviluppo di questo tumore e della sua progressione [75].

### **miR-29 family**

I membri della famiglia miR-29 sono presenti in due loci genici: miR-29a/b1 si trovano sul cromosoma 7 (7q 32.2) , e i miR-29 b2/c sono posizionati sul cromosoma 1 (1q 32.2). Anche se il miR 29-b è codificato da due distinti precursori (pre-miRNAs), la sequenza derivante da entrambi i loci è identica.

Recenti studi hanno mostrato che i membri della famiglia miR-29 possono giocare un ruolo importante in svariate tipologie di cancro umano attraverso la loro capacità di regolare la proliferazione cellulare, il differenziamento, l'apoptosi, la migrazione e l'invasione.

In letteratura, ad esempio, il miR-29b è considerato marker prognostico nella patologia tumorale coloretale ed è correlato negativamente alla patogenesi e all'evoluzione sia del tumore alla mammella che all'epatocarcinoma.

In particolare è stato dimostrato che i miR-29 sono in grado di regolare molti mRNAs di proteine della matrice extracellulare come collagene, elastina e fibrillina, così come proteine coinvolte nei processi migratori e di metastasi (MMP-2 e Mcl-1) [76]. Inoltre la proteina SPARC è annoverata tra i target putativi del miR-29-b1.

Wang *et al* hanno valutato, in cellule di cancro alla mammella MCF-7, l'impatto del miR-29b sulla globale espressione di mRNAs attraverso analisi di *microarray*. Tramite esperimenti con *Luciferasi reporter* hanno dimostrato che tra questi mRNA, in particolare quello della proteina SPARC risulta essere realmente target del miR-29b. In questo studio la degradazione di SPARC mediata dal miR-29b porta ad una maggiore invasività delle cellule MCF-7 [77].

Studi simili sono stati condotti in cellule di cancro al polmone, in cui è stato dimostrato che il miR-29b è poco espresso in linee cellulari tumorali con elevati livelli di Snail, mentre l'aumentata espressione del miR-29b determina inibizione dell'espressione di SPARC [78].

I livelli di membri della famiglia miR-29 risultano bassi in varie tipologie di cancro e in queste circostanze è stata dimostrata la loro azione in qualità di oncosoppressori. In particolare, sono considerati regolatori positivi del differenziamento osteogenico e controllano l'espressione del collagene negli osteoblasti differenziati.

Studi recenti mostrano come la riduzione dei livelli dei membri della famiglia miRNA-29 (miR-29 a/b/c: miR-29s) sia un evento frequente in tessuti di osteosarcoma e che l'iperespressione forzata dei membri della famiglia miR-29 sia in grado di inibire la proliferazione cellulare e promuovere l'apoptosi delle cellule tumorali [79].

## **VESCICOLE EXTRACELLULARI**

Come precedentemente accennato l'interazione cellula-cellula e cellula-ambiente extracellulare è fondamentale anche nello sviluppo e progressione tumorale e in tale ambito la comunicazione intercellulare diviene di fatto strategica. Negli ultimi anni ha assunto particolare rilievo il meccanismo di comunicazione intercellulare che prevede il trasferimento intercellulare di vescicole extracellulari (EVs). Mentre è da tempo studiato ed ormai ben conosciuto il rilascio di corpi apoptotici da cellule "morenti", ancora oggetto di recenti ricerche è il rilascio di vescicole dalla membrana di cellule "sane".

Alla luce di recenti studi è stato dimostrato che le microvescicole rappresentano un nuovo meccanismo di comunicazione cellulare e sono anche parte integrante del microambiente intercellulare [80-83]. E' stato dimostrato che le vescicole extracellulari vengono rilasciate da svariati tipi cellulari: non soltanto linfociti B e cellule dendritiche [84,85], ma anche da altre linee cellulari appartenenti alla linea ematopoietica e non, come linfociti T citotossici, piastrine, mast cellule, oligodendociti, neuroni, cellule di Shwan [86,87]. Il rilascio delle vescicole può essere un processo costitutivo oppure richiedere un segnale di attivazione. Le vescicole extracellulari sono importanti sia nei processi fisiologici che in quelli patologici. Esse sono coinvolte nella comunicazione cellulare in quanto possono trasportare a distanza componenti di membrana che mediano l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice nella coagulazione, nell'infiammazione [82]. Per esempio, le vescicole prodotte dalle piastrine, interagendo con le cellule endoteliali, inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie, risultando coinvolte nel processo infiammatorio e nella tumorigenesi [88].

Le cellule rilasciano nel microambiente extracellulare differenti tipologie di vescicole, generalmente definite microvescicole, ectosomi, vescicole gemmanti o microparticelle. Il termine esosomi è stato invece inizialmente utilizzato per indicare le vescicole con un diametro compreso tra 40 e 1 000 nm rilasciate da differenti tipi cellulari in coltura. In seguito questa nomenclatura è stata adottata per le vescicole di 40-100 nm rilasciate durante il differenziamento dei reticolociti come conseguenza della fusione di endosomi multivescicolari (MVE) con la membrana plasmatica. Negli anni successivi è stato dimostrato che differenti tipi cellulari, anche non di origine ematopoietica, possono rilasciare esosomi. Inoltre esosomi sono stati ritrovati in differenti fluidi biologici come la saliva, il liquido seminale, il latte e il sangue a dimostrazione che essi possono gestire la comunicazione intercellulare anche a distanza [89].

Ad oggi è noto che le microvescicole differiscono tra loro per origine, dimensioni ed anche per composizione antigenica, possono cioè variare i fosfolipidi, le proteine ed altre molecole che vengono espresse in superficie così come differente può essere il loro *cargo*. Vista la loro differente natura, l'International Society for Extracellular Vesicles, ha suggerito di utilizzare il termine *vescicole extracellulari* (EVs) per indicare genericamente tutte le vescicole che possono essere rilasciate nell'ambiente extracellulare, cioè esosomi, vescicole di membrana, microparticelle (rilasciate dalle piastrine) ed ectosomi (rilasciate dai leucociti polimorfonucleati), e corpi apoptotici che sono più grandi sia degli esosomi che delle vescicole di membrana e contengono acidi nucleici, organelli cellulari e porzioni citoplasmatiche o di membrana che vengono rilasciati dalle cellule durante il processo apoptotico. E' stato infatti recentemente dimostrato che sia esosomi che microvescicole possono essere rilasciati contemporaneamente da uno stesso tipo cellulare, come ad esempio piastrine, cellule endoteliali o cellule di cancro alla mammella [89].

### **Ruolo delle EVs nella tumorigenesi**

I tumori adottano innumerevoli strategie per manipolare il microambiente nel quale si sviluppano ed eludere il sistema immunitario. È stato dimostrato che le EVs derivate da cellule tumorali sono in grado di favorire il mantenimento delle cellule tumorali attraverso due modalità: imitando la risposta immunitaria in modo tale da sfuggire da essa e creando un microambiente tumorale favorevole al tumore stesso. È stato dimostrato che le cellule tumorali rilasciano sia in vitro che in vivo gli esosomi, che sono stati ritrovati sia nel sangue periferico [90], che nelle effusioni tumorali [91] e nelle urine di pazienti affetti da patologia tumorale [92].

Il ruolo delle EVs nella tumorigenesi è oggi un attualissimo e controverso argomento di svariati studi i quali mostrano come a volte gli esosomi ed in generale le vescicole extracellulari rilasciati dalle cellule tumorali abbiano un ruolo pro-tumorigenico mentre a volte esercitano al contrario effetti anti tumorali. Queste ragioni ne fanno buoni candidati nella terapia contro il cancro.

### *Effetti Anti-Tumorigenici delle vescicole extracellulari*

Molti studi mostrano come le vescicole rilasciate da cellule tumorali non soltanto possono sopprimere il sistema immunitario, ma anzi lo possono attivare. Numerosi ricercatori hanno dimostrato che gli esosomi tumorali provenienti da linee cellulari o da

effusioni tumorali e da pazienti con tumore possiedono elevati livelli di MHC di classe I, heat-shock proteins e trasportano specifici antigeni tumorali i quali sono a loro volta in grado di attivare in vitro l'immunità anti-tumorale di linfociti T citotossici tumore-specifici [93].

Le vescicole extracellulari hanno molteplici funzioni le quali dipendono sia dalle cellule di origine che dal loro stato fisiopatologico, tutte ragioni che possono influenzare il *cargo* vescicolare. In un primo momento queste funzioni furono associate alle proteine trasportate dalle vescicole, oggi l'attenzione è rivolta soprattutto alla presenza e al ruolo dell'RNA trasportato soprattutto dagli esosomi nella comunicazione cellula-cellula. Valadi *et al* non solo hanno mostrato la presenza di RNA all'interno degli esosomi ma hanno spiegato come questi possano essere trasferiti da una cellula ad un'altra. In definitiva anche se gli esosomi non contengono il macchinario di produzione delle proteine, essi trasportano i mRNA da una cellula donatrice a quella ricevente, nella quale infine avverrà la traduzione [94].

Successivamente sono stati pubblicati molti studi che valutano l'espressione di RNA all'interno degli esosomi rilasciati da differenti tipi cellulari e la funzione e il ruolo biologico del trasferimento dell'RNA esosomale. Queste ricerche sono state condotte in differenti ambiti dalla biologia cellulare, alla riproduzione [95], all'immunologia [96] al cancro [97].

È stato dimostrato che gli esosomi non solo possono essere internalizzati da cellule recipienti ma l'RNA esosomale può anche essere trasportato nel citosol dove i messaggeri possono essere tradotti e i miRNA esplicare la loro funzione di inibitori della traduzione. Montecalvo *et al* hanno dimostrato che gli esosomi possono interagire con cellule recipienti fondendosi con la membrana plasmatica e rilasciano il loro *cargo* esosomale nel citosol [98].

Studi simili sono stati condotti da Skog *et al* i quali hanno dimostrato che l'RNA esosomale derivato da cellule di glioblastoma può essere trasferito ed espresso in cellule riceventi [97].

La complessità della comunicazione tramite RNA esosomali è stata anche dimostrata da Zhang *et al* nel 2012, i quali scoprirono la presenza di miRNA esogeni (ad esempio il miR-156a e il miR-168a) da piante nel siero umano e la possibilità che questi microRNA possano regolare l'espressione genica nell'organismo ospite viaggiando trasportati dalle microvescicole [99].

## ***Obiettivo della tesi***



Negli ultimi anni la ricerca in campo oncologico si è focalizzata sullo studio di specifici aspetti di quei processi cellulari che possono svolgere dei ruoli fondamentali negli eventi di morte indotti dall'utilizzo di molecole naturali o di sintesi ad azione antitumorale. E' stato dimostrato che tra questi eventi sicuramente lo stress del reticolo endoplasmatico e l'attivazione del processo autofagico, in alcuni modelli sperimentali, possono essere eventi primari nel determinare il destino cellulare.

Inoltre, lo studio dei pathways molecolari indotti da droghe ad azione antitumorale ha evidenziato nuovi livelli di regolazione sia nell'ambiente intra- che extracellulare. Tra questi sicuramente merita attenzione l'evidenza dei miRNA come controllori post-trascrizionali e la vescicolazione come modalità di comunicazione intercellulare.

Studi condotti dal gruppo di ricerca con il quale ho sviluppato il mio progetto di tesi avevano dimostrato che il cannabinoide sintetico WIN è un efficace induttore di morte apoptotica in cellule di carcinoma colo-rettale che si accompagna a stress del reticolo e autofagia [100]. Inoltre altri studi avevano dimostrato la capacità del WIN, impiegato a dosi molto basse, di sensibilizzare cellule di epatocarcinoma all'azione di TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) una citochina naturale che di preferenza induce apoptosi nelle cellule tumorali, mentre non è tossica per le cellule normali [22].

L'insieme di tali informazioni ci ha suggerito di iniziare un ampio studio per valutare gli effetti dei cannabinoidi sulla proliferazione e migrazione di cellule di osteosarcoma umano MG63 obbiettivo alla delineazione dei pathway molecolari (tra cui l'interplay tra ER stress/autofagia/apoptosi e produzione di vescicole) e dei principali fattori (SPARC, PAR-4, miR-29-b1) coinvolti in tali processi.

## ***Materiali e Metodi***

## **Culture cellulari**

Questo studio è stato condotto su cellule di osteosarcoma umano MG63. Le cellule sono state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplementato con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) al 10% (precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti), L-glutamina 2 mM e una soluzione di antibiotici e antimicotici (100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina e 250 ng/ml amfotericina B). Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> nelle quali aderiscono disponendosi su un monostrato.

Per valutare gli effetti indotti dai composti, le cellule, dopo distacco con la soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), sono state seminate in piastre da 6, da 24 o da 96 pozzetti a seconda degli esperimenti da effettuare. In seguito al piastramento, le cellule vengono lasciate ad incubare per circa 24 ore per permetterne l'adesione alla piastra. Il giorno successivo le cellule sono state trattate con i composti a concentrazioni e a tempi variabili.

Nelle analisi condotte impiegando i cannabinoidi, 4-6 h prima dei trattamenti, il mezzo di coltura è stato rimosso e sostituito con terreno fresco contenente FBS al 2%, così come riportato da molti autori. Per ogni esperimento è stata effettuata parallelamente una prova controllo costituita da cellule trattate con il solo mezzo in cui sono stati solubilizzati i composti.

## **Saggi di vitalità cellulare**

La vitalità cellulare è stata analizzata con due differenti saggi. Uno di questi è un dosaggio quantitativo colorimetrico che utilizza il sale MTT (3-(4,5-dimetilthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), un sale tetrazolico di colore giallo che, in seguito a riduzione da parte delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali, forma un precipitato di colore blu-violetto (formazan) la cui intensità è direttamente proporzionale alla vitalità cellulare residua.

Per questo saggio, condotto in piastre da 96 pozzetti, le cellule al termine dei trattamenti, vengono incubate con 20µl di una soluzione di MTT (11 mg/ml di PBS) per pozzetto per circa 2 ore a 37°C. Successivamente, il terreno è rimosso e le cellule lisate con una soluzione ottenuta solubilizzando SDS al 20% in dimetilformamide al 50% (pH 7.4).

Infine, mediante lettore per micropiastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies), è stata effettuata la valutazione spettrofotometrica, misurando la differenza tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 e 630 nm. I dati sono riportati come percentuale di vitalità residua rispetto al controllo in cui la capacità di riduzione del sale viene considerata il 100% di vitalità.

La vitalità è stata valutata anche attraverso colorazione con arancio di acridina ed etidio bromuro (AO/ET). Al termine dei trattamenti le cellule sono state colorate con una soluzione composta da 50 µg/ml di arancio di acridina e 50 µg/ml di etidio bromuro. Le cellule sono state esaminate utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DM IRB, utilizzando i filtri FITC e Rodamina. Le immagini sono state ottenute utilizzando una fotocamera collegata al microscopio (Leica DC300F).

### **Analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare**

Per analizzare la distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo, dopo trattamento con i composti, le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione e risospese in una soluzione ipotonica contenente 50 µg/ml di ioduro di propidio, 0.1% sodio citrato, 0.01% Nonidet NP-40 and 10 µg/ml di RNasi per almeno 2 ore a 4°C. L'analisi è stata effettuata utilizzando un citofluorimetro Epics XL (Beckman Coulter) dotato di software Expo32, escludendo dall'analisi la popolazione di detriti e aggregati cellulari. La percentuale di cellule in fase sub-G0-G1 è considerata indice di cellule morte che presentano DNA frammentato.

### **Analisi dell'autofagia**

L'autofagia è stata analizzata colorando le cellule con arancio di acridina (AO) (2 µg/ml in PBS) a 37°C per 15 minuti al buio. Le immagini sono state visualizzate al microscopio a fluorescenza usando i filtri FITC e Rodamina. Per quantificare l'emissione di fluorescenza rossa e verde le cellule sono state staccate, risospese in PBS ed analizzate al citofluorimetro. L'incremento della fluorescenza rossa è indicativo di aumento del numero di autofagosomi.

La formazione di vacuoli acidi è stata analizzata attraverso colorazione con monodansilcadaverina (MDC). Le cellule sono state colorate, direttamente in piastra, con MDC 0,05 mM in PBS per 10 minuti a 37°C al buio e analizzate al microscopio a fluorescenza usando il filtro DAPI.

### **Analisi dei livelli proteici mediante immunoblotting**

Gli estratti proteici sono stati preparati lisando le cellule in un tampone RIPA contenente un cocktail di inibitori di proteasi. Dopo aver sonicato ciascun campione per tre cicli da 10 secondi, il contenuto proteico è stato quantizzato utilizzando il metodo di Bradford. Dopo il dosaggio, campioni di 40 µg di proteine sono stati caricati su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) per la separazione delle proteine. Terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa attraverso la tecnica dell'elettroblotting. I filtri sono stati incubati con anticorpi specifici per le proteine di nostro interesse. La visualizzazione finale è stata effettuata attraverso un sistema colorimetrico o attraverso un sistema chemiluminescente. Il controllo di caricamento è stato fatto sfruttando sia la colorazione con rosso Ponceau, sia la rilevazione dell'actina. La densità relativa delle bande è stata valutata utilizzando il software Image J e Quantity One.

### **Saggio di Immunoprecipitazione**

Per questi esperimenti le cellule, seminate in capsule Petri ad una concentrazione di  $10^5$ /ml, al termine dell'incubazione con i composti sono state lisate mediante trattamento con tampone RIPA (500 µl) e con l'ausilio di un raschietto. Il lisato è posto a 4°C per 15 minuti in agitazione e poi centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti in centrifuga refrigerata.

Recuperato il supernatante è stata effettuata la fase di chiarificazione per eliminare le aspecificità mediante aggiunta di 20 µl di proteina A/G coniugata con biglie di agarosio e incubazione a 4 °C per 10 minuti su un agitatore. Le biglie sono state, quindi, eliminate per centrifugazione a 14000 rpm per 10 minuti e il supernatante trasferito in un tubo da centrifuga. La determinazione della concentrazione proteica del lisato cellulare è stata eseguita usando il saggio Bradford. Quindi 500 µg di proteine sono stati incubati con un volume opportuno di anticorpo specifico per immunoprecipitare la proteina di nostro interesse e lasciato incubare tutta la notte a 4° in un agitatore rotante. E' stato preparato anche un campione da utilizzare come controllo negativo (*mock*) al quale non è stato aggiunto l'anticorpo. Il giorno seguente, sono stati aggiunti 20 µl di proteine A/G e si è lasciato incubare per 1 h a temperatura ambiente e in agitazione per catturare l'immunocomplesso. L'immunocomplesso è stato precipitato mediante centrifugazione (20 secondi in microcentrifuga a 14000 rpm). Eliminato il supernatante, il pellet è stato lavato per tre volte con PBS. Dopo l'ultima centrifugazione il pellet è

risospeso in 40 µl di sample buffer 2X. Per permettere la dissociazione delle biglie dal complesso proteico, si è lasciato incubare a 95°C per 5 minuti in agitazione. Infine, dopo centrifugazione per precipitare le biglie, il supernatante è stato caricato su gel di SDS-poliacrilammide. Terminata la corsa elettroforetica è stato eseguito un tradizionale western blotting trasferendo il complesso proteico su un filtro di nitrocellulosa.

## **Esperimenti di trasfezione**

### *Silenziamento genico mediante small interfering RNA*

In questo studio abbiamo utilizzato gli *small interfering RNA* (siRNA) utilizzati contro i messaggeri delle proteine SPARC, CHOP, GRP-78 e Beclina-1. Come controllo negativo, per tutti gli esperimenti, sono stati utilizzati anche dei *siRNA scramble*.

Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e il silenziamento è stato effettuato quando queste hanno raggiunto circa il 50% di confluenza. Gli *small interfering RNA* sono stati trasfettati nelle cellule utilizzando due diversi agenti trasfettanti, il Metafectene (Biontex) per i *siRNA* di CHOP e SPARC e la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) per il *siRNA* di GRP-78 e della Beclina-1. Per il silenziamento genico di CHOP è stato impiegato un siRNA (DHARMACON) alla concentrazione 100 nM (sequenza 5'-AAGAACCAGCAGAGGUCACAA-3'). Per il silenziamento genico di GRP78/Bip e Beclina-1 sono stati impiegati siRNA specifici (Santa Cruz) alla concentrazione di 50 nM per GRP78 e 40 nM per la Beclina-1. Per il silenziamento genico di SPARC è stato utilizzato un siRNA (sequenza 5'-AACAAGACCUUCGACUCUCC-3') ad una concentrazione finale di 30 nM.

La trasfezione, in tutti i casi, è stata eseguita in terreno privo di siero e di antibiotici. Dopo circa 6 ore dall'inizio della trasfezione il terreno è stato rimpiazzato con terreno fresco completo. Le cellule sono state trattate con i composti dopo circa 24 ore dal blocco della trasfezione. Il tempo totale di silenziamento è stato di 48 ore per le proteine CHOP, GRP78 e Beclina-1, e di 72 ore per la proteina SPARC.

### *Trasfezione con miR-29-b1 mimic*

In questo studio abbiamo trasfettato le cellule MG63 con il miR-29b-1 mimic (hsa-miR-29-b1 mimic, Sigma Aldrich) alla concentrazione 80 nM, al fine di incrementarne i livelli. Come controllo è stato utilizzato un miRNA controllo negativo.

Le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti e sono state trasfettate quando queste avevano raggiunto circa il 50% di confluenza. Come agente trasfettante è stata utilizzata la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La trasfezione è avvenuta in terreno privo

di siero e di antibiotici. Dopo circa 6 ore dall'inizio della trasfezione il terreno è stato rimpiazzato con terreno fresco completo. Il tempo complessivo della trasfezione è stato di 72 ore.

### **Valutazione di GRP78 di superficie**

#### *Valutazione qualitativa*

Al fine di valutare la presenza di GRP78 di superficie cellulare, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti, e dopo il trattamento con i composti per 16 ore, sono state fissate utilizzando formaldeide al 3,7% per 5 minuti e incubate con l'anticorpo primario contro GRP78 per tutta la notte a 4°C. Sono stati effettuati dei lavaggi con PBS e la piastra è stata incubata per 1 ora al buio con un anticorpo secondario specifico coniugato con il fluorocromo FITC. Al termine, dopo un lavaggio in PBS, i nuclei sono stati colorati con Hoechst vitale e le cellule analizzate al microscopio a fluorescenza, usando i filtri FITC e DAPI.

#### *Valutazione quantitativa*

Al fine di quantizzare l'espressione di GRP78 sulla superficie cellulare, le cellule sono state staccate attraverso tripsinizzazione, risospese in PBS contenente albumina allo 0,1% e incubate con l'anticorpo specifico per GRP78 o con un controllo isotipico per 30 minuti. Al termine dell'incubazione è stato effettuato un lavaggio per rimuovere l'eccesso di anticorpo e le cellule sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con FITC. Dopo 30 minuti trascorsi al buio e a 4°C, le cellule sono state risospese in PBS e analizzate al citofluorimetro.

### **RT-PCR per SPARC**

L' RNA è stato isolato utilizzando RNeasy mini kit (Qiagen). Il cDNA è stato amplificato partendo da 1 µg di RNA utilizzando QuantiScript Qiagen e impostando una PCR. Come controllo negativo è stata effettuata una reazione in assenza della trascrittasi inversa. Per dimostrare l'uguale caricamento di RNA tra i vari campioni è stato utilizzato come gene *housekeeping* GAPDH. I prodotti amplificati sono stati fatti migrare in gel da elettroforesi all' 1% di agaroso, la visualizzazione delle bande e l'acquisizione delle immagini sono state realizzate mediante l'utilizzo di Chemi Doc XRS (Bio-Rad). Le sequenze dei primers utilizzati (Prologo) sono le seguenti: SPARC, forward 5'-TGATGATGGTGCAGAGGAAA-3' and reverse 5'-GGGGGATGTAT

TTGCAAGG-3'; GAPDH, forward 5'-TGACATCAAGAAGGTGA-3' and reverse 5'-TCCACCA CCCTGTTGCTGTA-3'. Per l'analisi di PCR è stato utilizzato il seguente protocollo termico: 94 °C per 2 min, 35 cicli a 94 °C per 15 s, 60 °C per 30 s, 72 °C per 60 s; estensione finale a 72 °C per 10 min.

### **Real time PCR per la valutazione dell'espressione del miR-29b-1**

L' RNA è stato estratto utilizzando il kit Direct Zol RNA mini-PREP (Zymo research). Inoltre è stato effettuato il trattamento con DNase. Dell'RNA totale estratto ne sono stati retrotrascritti 20 ng in un volume finale di 10 µl utilizzando il kit miRCURY LNA<sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR (Exiqon) seguendo il manuale di istruzioni.

Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per effettuare le analisi quantitative mediante real-time PCR (qPCR) utilizzando primers (Exiqon) specifici per il miR-29-b1 e SYBR Green Master Mix (Exiqon). La reazione è stata condotta in piastre da 96 pozzetti. La mix di reazione è stata così ottenuta: 4 µl di cDNA (cDNA diluito 1:10), 5 µl di SYBR Green Master Mix 2X, 1 µl di PCR primers. Ciascuna reazione di qPCR è stata realizzata in triplicato e ripetuta per conferma. Il protocollo termico utilizzato è il seguente: 95 °C per 10 min, 40 cicli di 95 °C per 10s e 60 °C per 1 min. Come controllo negativo è stato preparato un campione privo di cDNA. Il processamento dei dati e l'analisi statistica sono stati fatti utilizzando il software IQ5 cycler. La relativa quantificazione dell'espressione del miR-29-b1 è stata determinata applicando il metodo  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e normalizzata utilizzando come controllo interno U6 snRNA (Exiqon).

### **Liofilizzazione**

Per l'analisi di western blotting delle proteine extracellulari è stata prevista la concentrazione dei terreni di coltura condizionati attraverso liofilizzazione. I terreni di coltura sono stati raccolti e sottoposti a dialisi per tutta la notte a 4°C utilizzando sacchetti con *cut off* di 10 KDa. In seguito i tubi contenenti i terreni dializzati sono stati liofilizzati dopo congelamento. I liofilizzati ottenuti sono stati poi risospesi in un volume di PBS idoneo per essere solubilizzati, quantizzati allo spettrofotometro mediante il metodo di Bradford per il dosaggio delle proteine e analizzati mediante western blotting.



### **Purificazione di vescicole extracellulari da terreni di coltura**

Le vescicole extracellulari sono state così isolate: i mezzi condizionati, in assenza di FBS, provenienti da cellule subconfluenti sono stati centrifugati a 1500 rpm per 10 min e a 3000 rpm per 15 min, i surnatanti sono stati ultracentrifugati a 38000 rpm per 90 min e i pellet così ottenuti sono stati risospesi in PBS filtrato. Il contenuto proteico delle vescicole è stato determinato allo spettrofotometro utilizzando il metodo di Bradford. Come standard è stata utilizzata albumina sierica bovina.

### *Saggio dell'attività dell'acetilcolinesterasi*

Al fine di appurare la presenza di vescicole è stata valutata l'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE). Brevemente, le vescicole (5 µl) sono state risospese in PBS filtrato (95 µl) e la sospensione è stata incubata con 1.25 µM acetiltiocolina cloruro (Sigma) e 0.1 mM 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico acido) (3,3'-6; Sigma). Infine è stato aggiunto PBS fino ad un volume finale di 1 ml e sono state misurate le differenze in assorbanza a 412 nm effettuando letture ogni 5 min per un tempo complessivo di 20 min.

### *Analisi quantitativa delle vescicole*

Le vescicole isolate sono state diluite in PBS filtrato contenente microsfere di calibrazione in polistirene con i seguenti diametri: 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 µm (Invitrogen). L'analisi citofluorimetrica è stata condotta con strumento BD FACSCanto (Franklin Lakes, NJ) per *forward scatter* (FS) e 90° *side scatter* (SS). I parametri FS e SS sono stati rappresentati in scala logaritmica.

### **Saggio del *wound healing***

I cambiamenti nelle capacità migratorie delle cellule cancerose sono stati analizzati mediante il test del *wound healing*. Le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti al fine di raggiungere approssimativamente il 90% di confluenza dopo una notte.. Dopo aver effettuato il taglio sul monostrato di cellule adese mediante un puntale sterile, sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS per rimuovere le cellule staccate dal substrato e il mezzo è stato rimpiazzato con terreno fresco allo 0.1% di FBS. La piastra è stata quindi incubata a 37°C e gli eventi migratori delle cellule lungo il taglio sono stati osservati nel tempo. Sono state acquisite le immagini (Leica DC300F camera) a partire dal T<sub>0</sub> (il tempo zero al momento del taglio) e poi dopo 8, 24 e 48 ore. Le

immagini sono state poi elaborate utilizzando il software Adobe Photoshop e l'area di migrazione è stata calcolata con l'ausilio del software ImageJ. La percentuale di chiusura della ferita è stata calcolata applicando la formula  $T_0 - T_x / T_0$ .

### **Zimografia**

L'attività enzimatica delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 è stata analizzata mediante zimografia in gel al 10% di poliacrilammide-SDS in presenza di gelatina. Le cellule sono state incubate con 5  $\mu$ M WIN per 24 h e i terreni condizionati provenienti da cellule controllo e cellule trattate sono stati raccolti e centrifugati a 2000 rpm per 5 min al fine di rimuovere cellule in sospensione e detriti. La concentrazione delle proteine totali è stata ottenuta tramite analisi spettrofotometrica mediante metodo Bradford (Bio-Rad). I surnatanti sono stati incubati con adeguato volume di SDS sample loading buffer in assenza di  $\beta$ -mercaptoetanolo e poi separati mediante elettroforesi. Dopo l'elettroforesi il gel è stato posto in un tampone rinaturante contenente 2.5% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) per 60 min a temperatura ambiente. In seguito, i gel sono stati incubati con una soluzione di sviluppo (0.15 M NaCl, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) per 24 h a 37°C, colorati con una soluzione contenente Coomassie brilliant blue R-250 per 2 h e decolorati in metanolo, acido acetico e acqua (50:10:40) fino a che le bande corrispondenti alle MMPs attive vengono visualizzate come bande bianche su un fondo blu. L'intensità delle bande è stata quantificata utilizzando il software ImageJ. L'attività delle gelatinasi MMP è stata confermata come 2 bande sullo zimogramma, quella con velocità migratoria più bassa relativa alla MMP-9 (94 kDa) e quella più veloce relativa alla MMP-2 (72 kDa). Come paragone è stato utilizzato uno standard di peso molecolare noto.

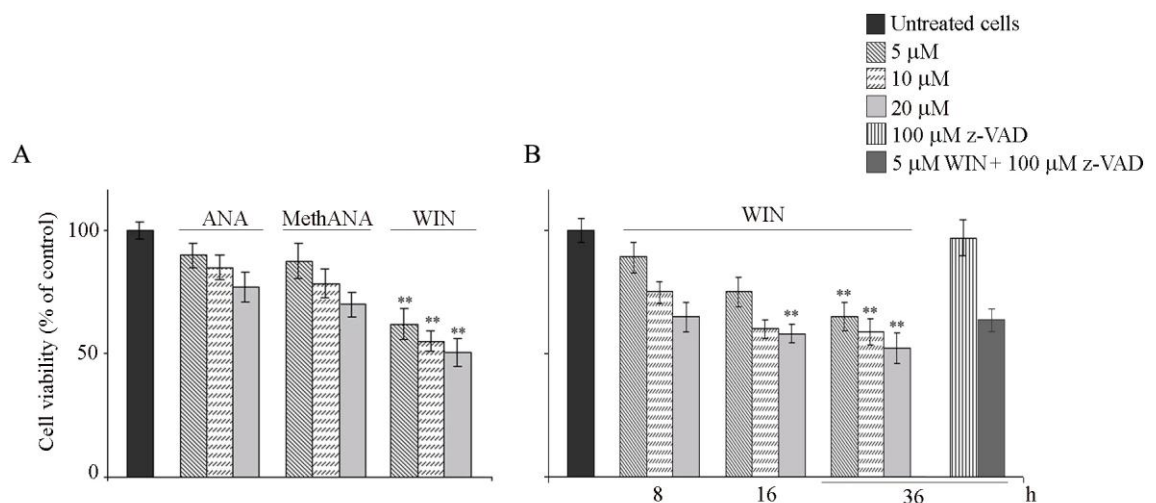
### **Analisi statistica**

I dati di vitalità cellulare sono stati espressi come media  $\pm$  S.E. e valutati utilizzando *Student's t-test*. Le differenze sono state considerate significative quando  $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

## ***Risultati***

### Valutazione degli effetti del WIN sulla vitalità di cellule MG63

Nello sviluppo del mio progetto di tesi ho voluto studiare se l'utilizzo dei cannabinoidi potesse ridurre le capacità proliferative di cellule di osteosarcoma umano. A tale scopo, le cellule MG63 sono state trattate per differenti tempi con varie dosi del cannabinoide endogeno anandamide (ANA), del suo analogo stabile met-anandamide (MethANA), o del cannabinoide sintetico WIN55,212-2 (WIN). L'analisi, effettuata attraverso saggio MTT, mette in evidenza che alla più alta dose utilizzata (20  $\mu$ M) soltanto il WIN riduce significativamente il numero cellulare (circa il 50%) mentre gli altri due cannabinoidi inducono soltanto modesti effetti (Figura 1A). Inoltre l'analisi nel tempo degli effetti indotti dal WIN mostra che la riduzione del numero cellulare è già evidente dopo 8 h di trattamento, raggiungendo il massimo tra le 16-36 ore di trattamento (Figura 1B).



**Figura 1. Effetti citotossici indotti dai cannabinoidi in cellule MG63.** (A) effetti di anandamide, Met-anandamide e WIN sulla vitalità di cellule MG63. Le cellule sono state incubate per 48 ore con differenti dosi (5, 10 e 20  $\mu$ M) dei cannabinoidi. (B) Effetti tempo e dose dipendenti del WIN sulla vitalità delle cellule MG63 e effetti dell'aggiunta di 100  $\mu$ M z-VAD in cellule trattate con 5  $\mu$ M WIN per 36 ore. La vitalità cellulare è stata stimata mediante saggio MTT, come riportato in materiali e metodi, e espressa come % rispetto al controllo.

Successivamente, abbiamo indagato se la riduzione del numero cellulare fosse associata a induzione di morte cellulare. Per questo scopo le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con arancio di acridina ed etidio bromuro. Il trattamento con WIN non induce morte apoptotica, le cellule appaiono uniformemente colorate in verde diffuso e soltanto in una piccola percentuale i nuclei mostrano spot rossi (Figura 2A).

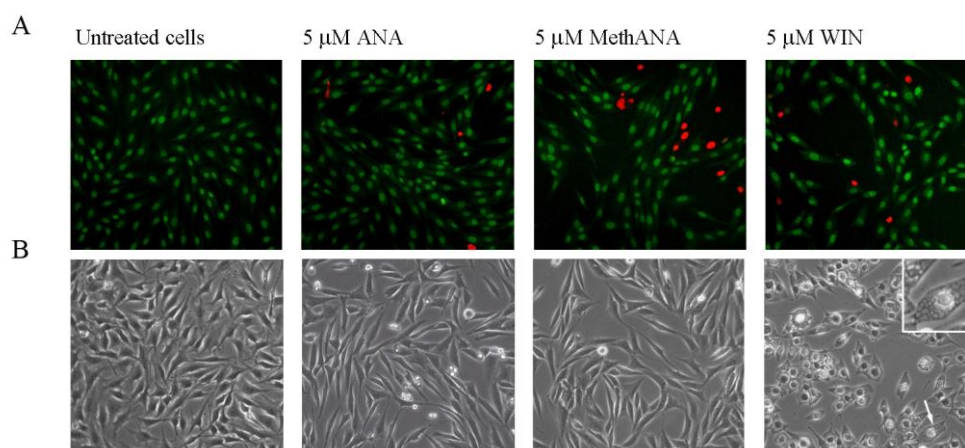
L'assenza di induzione di morte è stata valutata anche attraverso l'analisi della distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo dopo colorazione con ioduro di propidio, che non ha mostrato rilevanti differenze nella percentuale di cellule confinate in fase sub G0-G1, dove si ritrovano le cellule con DNA frammentato. In seguito al trattamento con WIN, si osserva un significativo incremento della percentuale di cellule confinate in fase G2-M del ciclo cellulare che raggiunge il 27% dopo 36 ore di trattamento con WIN 5  $\mu$ M (Tabella 1). Questo dato giustifica la riduzione del numero cellulare osservata attraverso il saggio MTT indicando, quindi, che il trattamento con WIN è correlabile ad un blocco proliferativo.

Inoltre, l'aggiunta dell'inibitore generico delle caspasi z-VAD, alla concentrazione 100  $\mu$ M, alle cellule trattate con WIN non induce alcuna variazione della vitalità cellulare rispetto alle cellule incubate con il solo WIN, confermando ulteriormente la mancata induzione di morte apoptotica (Figura 1B).

	Sub G0-G1 %	G0-G1 %	G2-M %
<b>CO</b>	1.2 $\pm$ 0.6	78.9 $\pm$ 2.1	13.4 $\pm$ 1.8
<b>5 <math>\mu</math>M ANA</b>	2.9 $\pm$ 0.7	84.5 $\pm$ 2.0	10.5 $\pm$ 1.4
<b>5 <math>\mu</math>M MethANA</b>	4.4 $\pm$ 0.9	81.8 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 1.5
<b>5 <math>\mu</math>M WIN</b>	5.7 $\pm$ 1.7	60.0 $\pm$ 1.9	26.7 $\pm$ 2.3

**Tabella 1** Valutazione citofluorimetrica del ciclo cellulare. Dopo trattamento con 5  $\mu$ M ANA, methANA e WIN per 36 ore le cellule sono state colorate con ioduro di propidio come riportato in materiali e metodi.

L'analisi al microscopio ottico mostra che i cannabinoidi sono capaci di indurre anche aberranti modifiche morfologiche nelle cellule MG63: le cellule trattate con ANA e MethANA appaiono allungate, traslucide e più isolate; le cellule trattate con WIN mostrano una forma più poligonale, con nuclei rigonfi e citoplasma fortemente vacuolizzato (Figura 2B). Questi risultati ci hanno spinto a proseguire i nostri studi utilizzando il WIN che, tra i cannabinoidi impiegati, si è mostrato l'unico capace di indurre effetti eclatanti.



**Figura 2. Effetti morfologici indotti dai cannabinoidi in cellule di osteosarcoma.** (A) Analisi al microscopio a fluorescenza di cellule MG63 dopo colorazione con arancio di acridina e etidio bromuro (AO/EB). Le cellule sono state trattate con 5  $\mu$ M di ANA, MethANA e WIN per 36 ore. Dopo la colorazione le cellule vitali mostrano nuclei verdi, mentre le cellule morte nuclei rossi. (B) Valutazione al microscopio ottico degli effetti morfologici indotti dai cannabinoidi dopo 36 ore di trattamento. L'inserto mostra un ingrandimento della cellula indicata dalla freccia. Le immagini sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti.

### **Il trattamento con WIN induce stress del reticolo endoplasmatico e autofagia in cellule MG63**

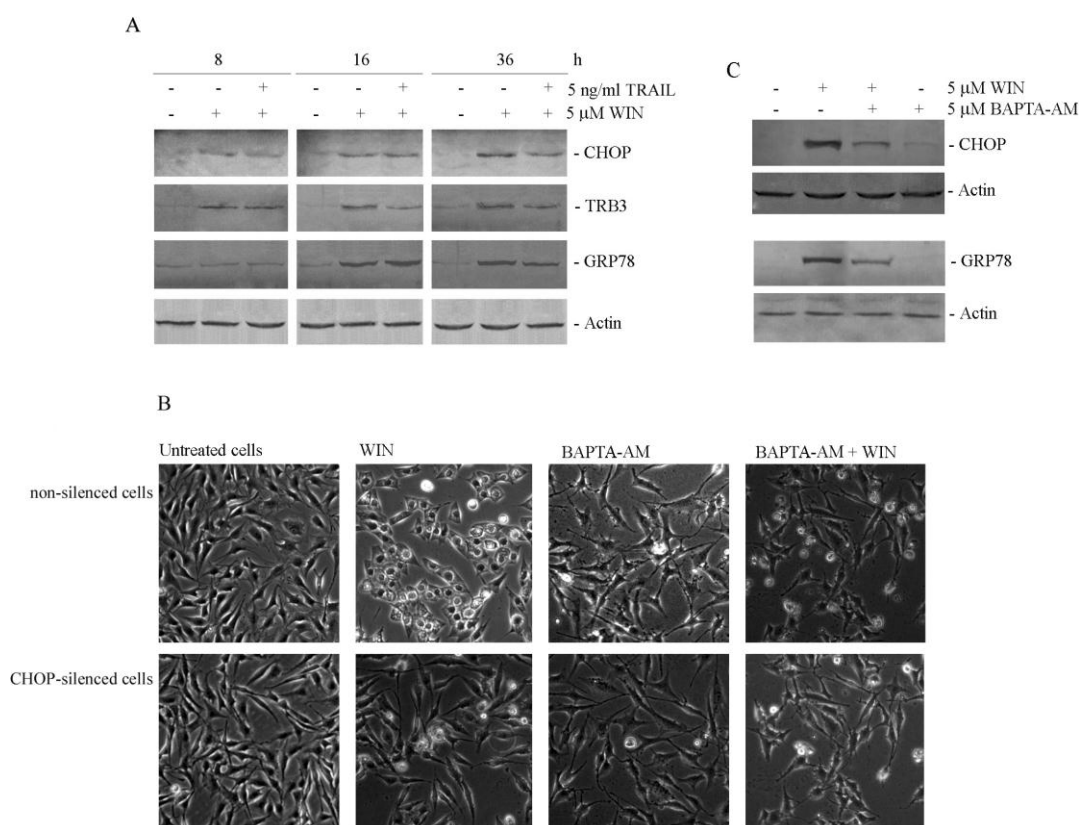
E' stato dimostrato che in differenti modelli sperimentali i cannabinoidi agiscono attraverso un meccanismo molecolare che coinvolge l'induzione di stress del reticolo endoplasmatico [27]. Per questo motivo abbiamo indagato questa relazione anche nel nostro modello sperimentale.

In un primo momento abbiamo analizzato i livelli delle proteine che sono considerate markers di stress del reticolo come CHOP, TRB3 e GRP78/Bip (GRP78). Come mostrato in Figura 3A, i livelli di CHOP, il fattore trascrizionale indotto in condizioni di stress cellulare come il misfolding proteico conseguente allo stress reticolare, incrementa in maniera tempo-dipendente in seguito al trattamento con WIN 5  $\mu$ M. L'effetto è già evidente dopo 8 ore di trattamento e raggiunge il suo massimo dopo 36 ore. Allo stesso modo anche i livelli di TRB3, target di CHOP, e di GRP78, la più importante *chaperone* reticolare, incrementano nel tempo dopo aggiunta del WIN.

Dato che molti dati bibliografici indicano una relazione tra l'ER stress e la vacuolizzazione citoplasmatica [101], abbiamo valutato gli effetti del silenziamento di CHOP, principale sensore dello stress del reticolo, sulla morfologia cellulare in seguito a trattamento con il WIN. Il silenziamento di CHOP è stato in grado di contrastare la formazione delle strutture vacuolari indotta dal WIN; nelle cellule silenziate infatti, la

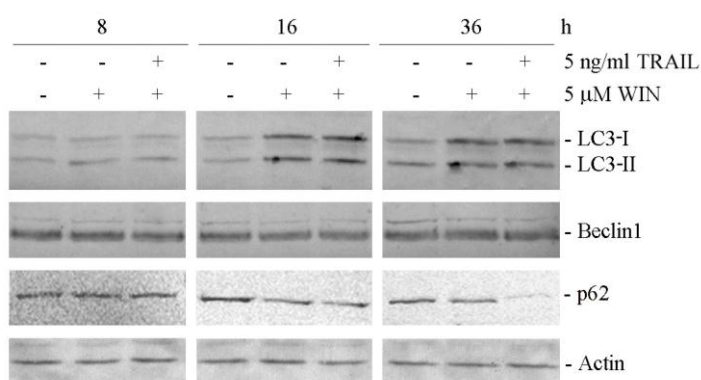
morfologia cellulare torna ad essere molto simile a quella delle cellule controllo (Figura 3B). Inoltre, al fine di dimostrare ulteriormente la correlazione tra la vacuolizzazione citoplasmatica e ER stress, e dal momento che la vacuolizzazione citoplasmatica è spesso associata all'incremento della concentrazione di calcio, abbiamo utilizzato il BAPTA-AM, un chelante del calcio intracellulare.

I dati riportati in Figura 3B mostrano che il BAPTA è in grado di contrastare gli effetti morfologici indotti dal cannabinoide sia nelle cellule silenziate che in quelle non silenziate per CHOP e, nello stesso tempo, è capace di contrastare anche l'incremento dei livelli di CHOP e di GRP78, confermando la dipendenza dell'ER stress dalla concentrazione del calcio intracellulare (Figura 3C).



**Figura 3. Il WIN causa stress del reticolo endoplasmatico.** (A) Effetti del trattamento con WIN 5 μM e TRAIL 5 ng/ml sui livelli proteici di CHOP, GRP78 e TRB3 dopo 8, 16 e 36 ore di trattamento. L'analisi di western blotting è stata effettuata come descritto in materiali e metodi. (B) Effetti morfologici dell'aggiunta del BAPTA-AM in cellule silenziate e non per CHOP. La vacuolizzazione è stata analizzata al microscopio a luce diretta dopo 24 ore di trattamento con WIN 5 μM e/o BAPTA 10 μM. (C) Analisi di western blotting dei livelli di CHOP e GRP78 dopo 36 ore di trattamento con WIN 5 μM e/o BAPTA 5 μM. In (A) e (C) il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

In seguito abbiamo analizzato il possibile coinvolgimento del pathway autofagico. La proteina associata ai microtubuli LC3, un marker della presenza di autofagosomi [102], è attivata in seguito al clivaggio della forma citosolica LC3-I in LC3-II e lipidazione che ne consente l'inserimento nella doppia membrana degli autofagosomi [103]. La valutazione mediante immunoblotting dei livelli della proteina ha mostrato che la banda corrispondente a LC3-II incrementa in maniera tempo-dipendente in seguito al trattamento con WIN; differentemente nessuna variazione è stata osservata nei livelli della beclina-1, proteina marker della formazione degli autofagosomi, suggerendo l'induzione di un percorso autofagico beclina -indipendente (Figura 4). L'analisi di p62, proteina multifunzionale coinvolta nell'autofagia selettiva e considerata marker dell'andamento del flusso autofagico [104], mostra invece un progressivo decremento dei livelli proteici, indicando il completamento del flusso autofagico con la degradazione del contenuto degli autofagosomi (Figura 4).

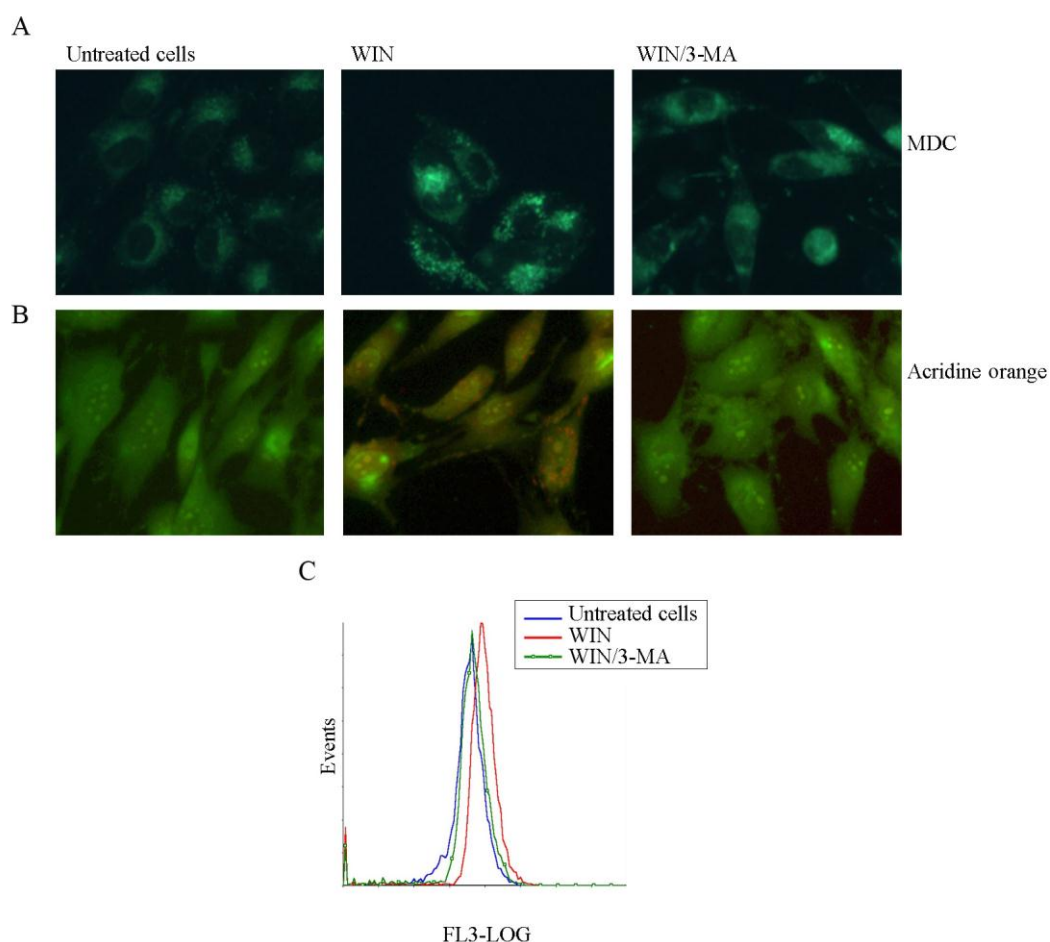


**Figura 4. Il WIN induce l'incremento dei marker autofagici.** Effetti del trattamento per 8, 16 e 36 ore con WIN 5 µM sull'espressione dei principali marker dell'autofagia. L'analisi è stata effettuata dopo western blotting come descritto in materiali e metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

La risposta autofagica al trattamento con WIN è stata valutata anche in seguito a colorazione con monodansilcadaverina (MDC), un marker della componente acida degli autolisosomi [105]. Come mostrato in Figura 5A, il trattamento delle cellule MG63 con WIN per 16 ore causa incremento della fluorescenza puntata verde, distribuita nel citoplasma o localizzata nella regione perinucleare, indicando la formazione di vescicole acide. Gli organelli acidi (AVOs), sono stati visualizzati anche in seguito a colorazione con arancio di acridina (AO), una base debole che si muove liberamente



attraverso le membrane biologiche e che emette fluorescenza rossa quando si accumula all'interno di compartimenti acidi [106]. L'analisi al microscopio a fluorescenza mostra un incremento delle vescicole acide nelle cellule trattate con WIN rispetto alle cellule controllo (Figura 5B). L'incremento della fluorescenza rossa è anche confermato dall'analisi citofluorimetrica che evidenzia lo spostamento verso destra del picco relativo alla fluorescenza rossa (Figura 5C). L'utilizzo della 3-metiladenina (3-MA), il più importante inibitore della fase iniziale processo autofagico [107] contrasta l'incremento di strutture autofagosomali indotte dal WIN, confermando così i risultati ottenuti mediante analisi di microscopia a fluorescenza e citofluorimetrica (Figura 5).



**Figura 5. Il WIN induce la formazione di autofagosomi.** Valutazione dei vacuoli autofagici indotti dal trattamento per 16 ore con WIN impiegato da solo o in combinazione con 3-metiladenina 5 mM. Dopo il trattamento le cellule sono state colorate con MDC 0.05 mM (A) e arancio di acridina (AO) 2 µg/ml (B) per 15 minuti a 37 °C e analizzate al microscopio a fluorescenza come descritto in materiali e metodi. (C) Analisi citofluorimetrica dell'emissione di fluorescenza rossa dopo colorazione con AO per 15 minuti a 37 °C.

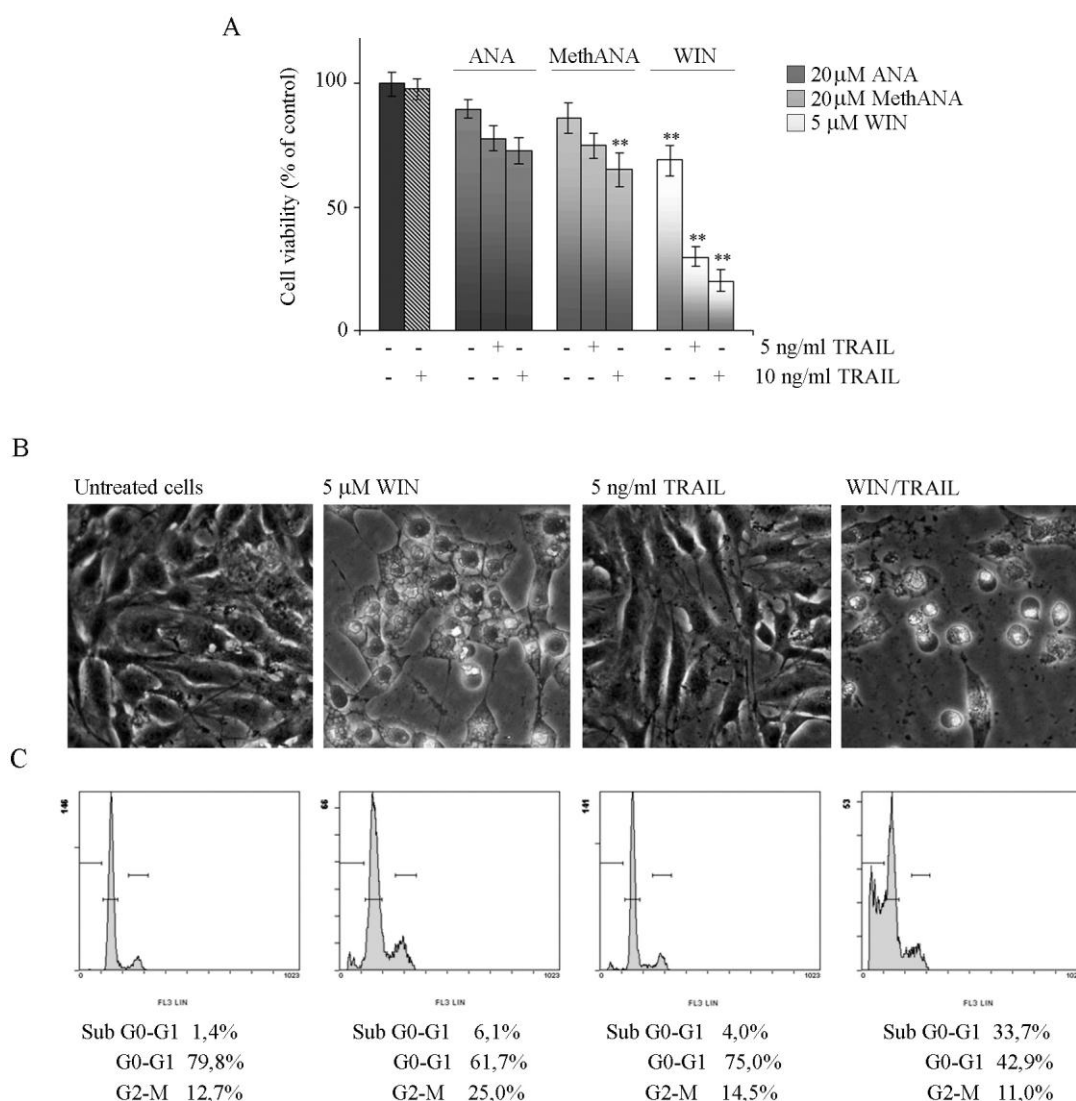
### **WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL**

Poiché precedentemente era stata dimostrata la capacità del WIN di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma HepG2 all'apoptosi indotta da TRAIL [22], abbiamo valutato gli effetti dell'aggiunta di TRAIL alle cellule MG63 trattate con il WIN. L'analisi della vitalità mediante saggio MTT ha evidenziato che le cellule MG63 risultano resistenti alla citochina mentre l'aggiunta di basse concentrazioni di TRAIL (5 ng/ml) alle cellule trattate con WIN è in grado di ridurre la vitalità fino a circa l'80% dopo 36 ore di trattamento (Figura 6A). Differentemente, le combinazioni ANA/TRAIL o MethANA/TRAIL (anche ad alte dosi) non sono in grado di incrementare in maniera significativa gli effetti dei cannabinoidi impiegati da soli (Figura 6A).

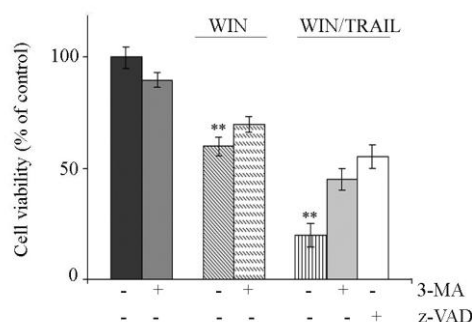
La riduzione della vitalità in seguito al trattamento combinato è stata confermata anche da analisi microscopiche. Le immagini mostrate in Figura 6B evidenziano la comparsa della tipica morfologia apoptotica, le cellule appaiono tondeggianti, con contorni irregolari, staccate dal substrato e flottanti nel mezzo di coltura. Il pathway apoptotico è stato confermato dalle analisi citofluorimetriche che hanno mostrato l'incremento della percentuale di cellule confinate in fase sub G0-G1 dopo 36 ore di trattamento combinato WIN/TRAIL ad indicare cellule con DNA frammentato (Figura 6C).

Il trattamento con l'inibitore generale delle caspasi, z-VAD (100  $\mu$ M) è in grado di contrastare la citotossicità indotta dal trattamento combinato WIN/TRAIL. Infatti, dopo 36 ore, la percentuale di cellule vitali è paragonabile a quella delle cellule trattate con il solo WIN (Figura 7).

Per meglio capire quale sia il contributo dell'autofagia nel meccanismo di morte indotto dal trattamento combinato WIN/TRAIL abbiamo analizzato anche gli effetti dell'aggiunta della 3-metiladenina, un inibitore del percorso autofagico, sulla vitalità di cellule MG63. Il risultato da noi ottenuto mostra che l'inibizione farmacologica dell'autofagia, mediante trattamento con 5 mM 3-metiladenina per 36 ore, riduce gli effetti citotossici indotti dal trattamento combinato (Figura 7).

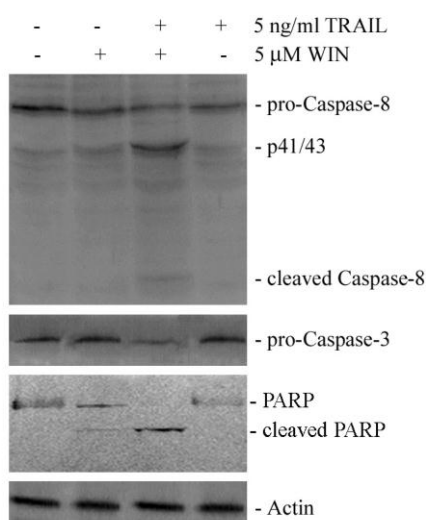


**Figura 6. Il WIN sensibilizza le cellule MG63 all'apoptosi indotta da TRAIL.** (A) Effetti del cannabinoide sintetico WIN e/o di TRAIL sulla vitalità di cellule MG63. Le cellule sono state trattate per 36 ore con i composti alle concentrazioni indicate. La vitalità è stata valutata attraverso saggio MTT come descritto in materiali e metodi. (B) Valutazione degli effetti morfologici indotti dal trattamento con WIN, TRAIL o dalla combinazione dei due composti in cellule MG63. (C) Analisi citofluorimetrica della distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo proliferativo. Le cellule sono state trattate per 36 ore con i composti alle concentrazioni indicate e colorate con ioduro di propidio come descritto in materiali e metodi.



**Figura 7. Valutazione degli effetti indotti dall'aggiunta degli inibitori della apoptosi e della autofagia sulla vitalità delle cellule MG63 incubate con WIN e/o WIN/TRAIL.** z-VAD 100  $\mu$ M o 3-MA 5 mM sono stati aggiunti a cellule MG63 trattate con WIN o con l'associazione WIN/TRAIL per 36 ore. La vitalità è stata valutata mediante saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi.

Le analisi di western blotting dei livelli delle caspasi indicano che il trattamento con WIN induce soltanto una leggera riduzione della forma pro-enzimatica delle caspasi-8 e -3, mentre il trattamento con l'associazione WIN/TRAIL porta alla riduzione delle forme pro-enzimatiche a più alto peso molecolare ed alla comparsa dei frammenti attivi a più basso peso molecolare della caspasi-8 (Figura 8). L'attivazione della caspasi-3 è confermata, invece, dall'analisi dei livelli della Poli-(ADP-riboso) polimerasi (PARP), uno dei principali target della caspasi-3 attiva. Questi risultati evidenziano che il trattamento con WIN è in grado di sensibilizzare le cellule MG63 all'azione di TRAIL, inducendo un pathway apoptotico canonico caspasi-dipendente.

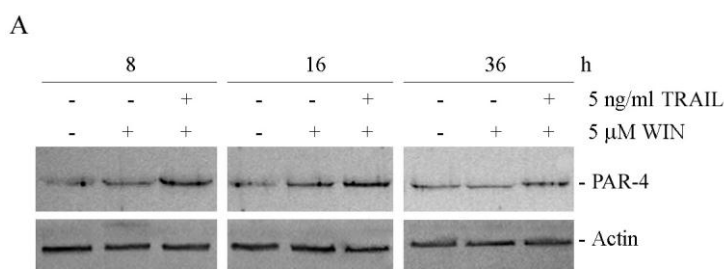


**Figura 8. Il trattamento combinato WIN/TRAIL attiva caspasi-8, caspasi-3 e PARP.** Analisi di western blotting dei livelli di espressione di caspasi-8, -3 e PARP in cellule MG63 trattate per 36 ore con WIN e/o TRAIL. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

## Studio delle proteine coinvolte nel meccanismo molecolare indotto dal WIN

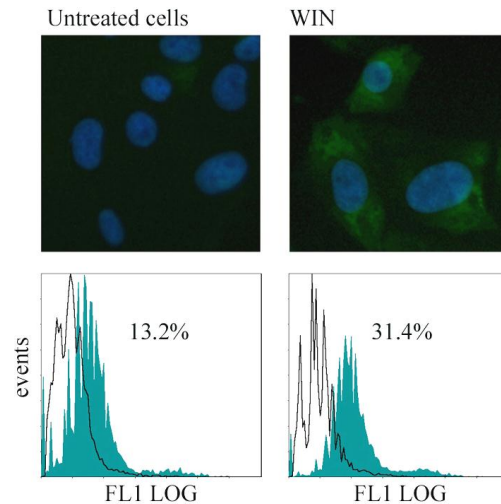
Avendo dimostrato l'induzione di apoptosi da parte della combinazione WIN/TRAIL, ci siamo chiesti quale degli eventi precoci indotti dal WIN nelle cellule MG63, ad esempio l'induzione di ER stress, potesse essere correlabile alla sensibilizzazione delle cellule agli effetti di morte indotti da TRAIL. A questo proposito studi bibliografici ci hanno suggerito una possibile correlazione tra GRP78, chaperone reticolare marker dello stress del reticolo e PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*, conosciuta anche come PAWR). Alcuni recenti lavori, infatti, mostrano che l'oncosoppressore PAR-4 è in grado di attivare il pathway apoptotico estrinseco interagendo con GRP78 a livello citoplasmatico e mediandone la traslocazione sulla membrana plasmatica [108], dove GRP78 agirebbe da recettore per fattori solubili extracellulari in grado di indurre apoptosi [109]. Al fine di valutare il possibile coinvolgimento di questo pathway nel nostro sistema sperimentale, inizialmente abbiamo analizzato i livelli di espressione di PAR-4 in seguito al trattamento con WIN e/o TRAIL. Come mostrato in Figura 9A, i livelli della proteina incrementano soprattutto dopo 16 ore di trattamento con WIN e si mantengono elevati anche nella condizione WIN/TRAIL.

Per valutare se anche nel nostro sistema sperimentale fosse presente la traslocazione di GRP78 sulla superficie cellulare, abbiamo valutato i livelli di espressione di GRP78 sulla membrana in seguito al trattamento con WIN attraverso analisi di immunofluorescenza e citofluorimetria mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico per la porzione C-terminale extracellulare di GRP78 in cellule non permeabilizzate (Figura 9B).



**Figura 9A. Il WIN induce incremento dei livelli di PAR-4.** Analisi tempo-dipendente degli effetti del trattamento con WIN e con WIN/TRAIL sui livelli della proteina PAR-4. Dopo il trattamento con i composti usati alle concentrazioni indicate, i lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

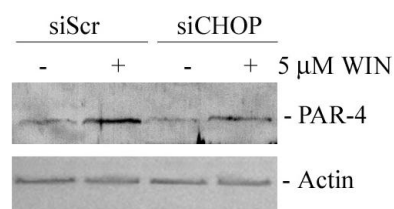
B



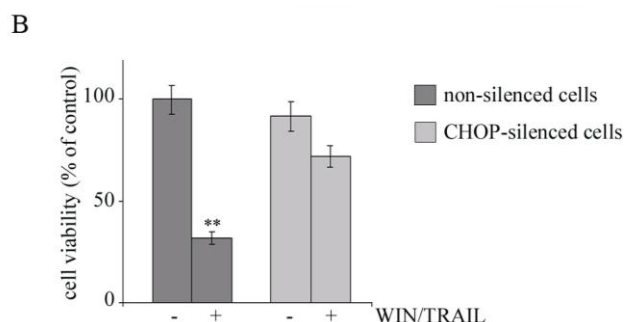
**Figura 9B. Il WIN induce incremento dei livelli di GRP78 sulla superficie cellulare.** Effetti del WIN sull'espressione di GRP78 sulla superficie cellulare. Pannello superiore, le cellule, dopo trattamento per 24 h con WIN 5  $\mu$ M, sono state incubate dapprima con un anticorpo contro GRP78 e poi con un anticorpo secondario coniugato con FITC e, quindi, analizzate al microscopio a fluorescenza come descritto in Materiali e Metodi. I nuclei sono stati colorati con Hoechst 33342. Pannello inferiore, analisi citofluorimetrica dell'incremento di espressione di GRP78 sulla superficie in seguito al trattamento con WIN. L'istogramma vuoto indica il controllo isotipico, l'istogramma pieno indica l'espressione di GRP78 nelle cellule non trattate e trattate con WIN.

Per studiare la relazione tra ER stress, l'espressione di PAR-4 e la citotossicità indotta dal trattamento combinato WIN/TRAIL, abbiamo analizzato i livelli di PAR-4 in cellule silenziate per CHOP. Come mostrato in Figura 10A, i livelli di PAR-4 in cellule silenziate per CHOP e trattate con WIN risultano essere marcatamente ridotti, indicando una possibile dipendenza dei livelli di PAR-4 dall'attività del fattore trascrizionale CHOP. Infine, analisi di vitalità condotte tramite saggio MTT mostrano un recupero della vitalità nelle cellule silenziate (Figura 10B).

A



**Figura 10A. Effetti del silenziamento della proteina CHOP sui livelli di PAR-4 in cellule MG63.** Valutazione, tramite analisi di western blotting, dei livelli di espressione delle proteine PAR-4 in cellule MG63 silenziate per CHOP e trattate con WIN 5  $\mu$ M. Il blot dell'actina è riportato come controllo di caricamento.



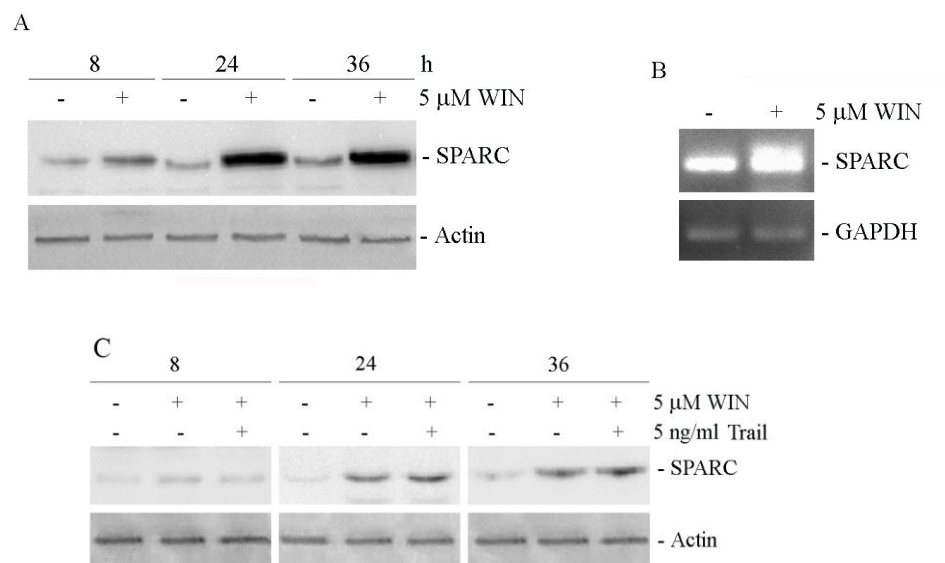
**Figura 10B. Effetti del silenziamento della proteina CHOP sulla vitalità delle cellule MG63.** Valutazione della vitalità cellulare in cellule MG63 silenziate per CHOP e trattate con 5  $\mu$ M WIN e/o 5ng/ml TRAIL per 24 ore. La vitalità è stata valutata con saggio MTT, come riportato in Materiali e Metodi, ed espressa come percentuale rispetto al controllo silenziato con siScr.

### **WIN induce un marcato incremento nei livelli di espressione della proteina SPARC che è responsabile della sensibilizzazione a TRAIL**

Nella seconda parte del triennio di corso mi sono occupata dello studio di SPARC, valutando i suoi livelli e il ruolo nel percorso biochimico indotto dal WIN. Come precedentemente introdotto, tra le molte funzioni di SPARC è stato recentemente dimostrato che essa è implicata nella soppressione della progressione tumorale. In molti tipi di cancro sono stati osservati bassi livelli di espressione di SPARC, e queste osservazioni hanno portato ad ipotizzare un suo ruolo inibitorio nella formazione del tumore [61-64]. Recentemente inoltre è stato dimostrato che l'iperespressione di SPARC può indurre apoptosi mediata da stress del reticolo in cellule di neuroblastoma [54].

Basandoci sull'osservazione che il WIN è capace di indurre ER stress sensibilizzando le cellule MG63 alla morte indotta da TRAIL, abbiamo indagato sulla possibile relazione tra induzione di ER stress e livelli della proteina SPARC ipotizzando che accanto a PAR-4 ci fosse un ulteriore *master regulator* correlabile allo stress del reticolo e, in ultimo, responsabile dell'innescio alla via apoptotica estrinseca e della sua realizzazione. L'analisi dei livelli di espressione di SPARC dopo trattamento delle cellule MG63 con i cannabinoidi ha evidenziato che in presenza di ANA e methANA i livelli di SPARC restano costanti nel tempo o comunque non mostrano variazioni significative, mentre il trattamento con WIN 5  $\mu$ M determina un consistente incremento tempo-dipendente della proteina.

Come mostrato in Figura 11A, WIN 5  $\mu$ M, la dose responsabile degli effetti morfologici e della sensibilizzazione a TRAIL, induce un incremento tempo-dipendente dei livelli di SPARC in cellule MG63. L'effetto è già evidente dopo 8 ore di trattamento e raggiunge il massimo tra le 24 e le 36 ore. Per valutare se l'incremento di SPARC sia conseguenza di attivazione trascrizionale ne abbiamo valutato l'espressione mediante RT-PCR. Il risultato, riportato in Figura 11B, mostra un incremento significativo nei livelli di espressione del mRNA di SPARC dopo 24 ore di trattamento con WIN rispetto alle cellule controllo non trattate.

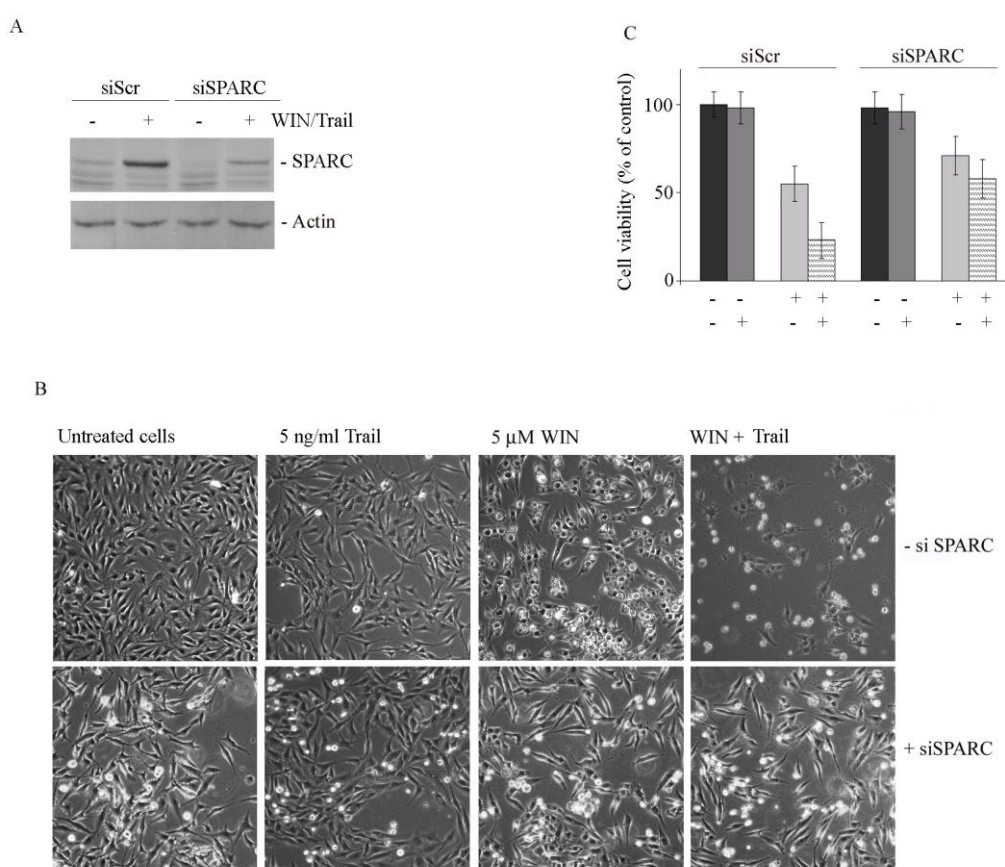


**Figura 11. Il trattamento con WIN incrementa l'espressione della proteina SPARC.** (A) Analisi dei livelli della proteina SPARC in seguito al trattamento per 8, 24 e 36 ore con 5  $\mu$ M WIN. (B) Valutazione tramite RT-PCR dei livelli del mRNA della proteina SPARC. La PCR è stata effettuata utilizzando primer specifici per SPARC come riportato in materiali e metodi. I livelli di espressione della GAPDH sono stati utilizzati come controllo. (C) Analisi dei livelli della proteina SPARC in seguito al trattamento per 8, 24 e 36 ore con 5  $\mu$ M WIN e 5 ng/ml TRAIL. In A e C i lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting usando un anticorpo specifico per la proteina SPARC come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Il risultato ottenuto ci ha spinto a valutare SPARC come possibile mediatore dell'effetto citotossico indotto dal trattamento combinato WIN/TRAIL. Dopo aver confermato che i livelli di SPARC rimangono elevati anche in presenza dell'associazione WIN/TRAIL (Figura 11C), abbiamo analizzato l'effetto indotto dalla *downregulation* dell'espressione di SPARC mediante l'utilizzo di un siRNA specifico che abbatta di circa il 70% i livelli di SPARC endogeno (Figura 12A).



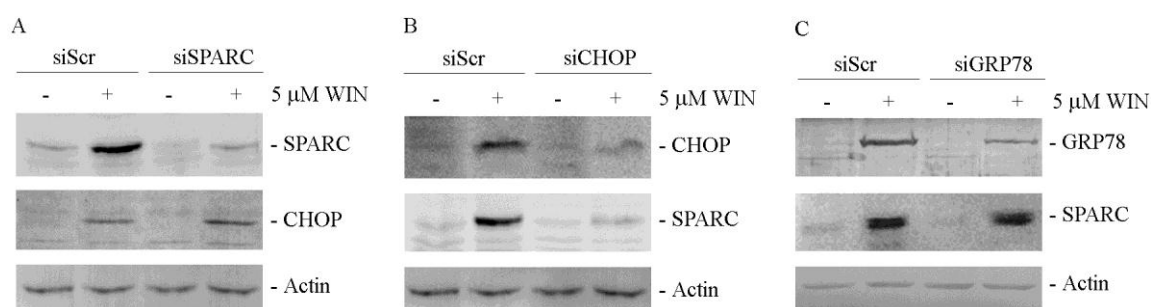
La Figura 12B mostra che nelle cellule silenziate per SPARC, il trattamento combinato WIN/TRAIL determina un modesto effetto citotossico rispetto alle cellule controllo non silenziate. Dopo 24 ore di trattamento con WIN o WIN/TRAIL le cellule trasfettate con siSPARC mostrano una morfologia molto simile a quella delle cellule controllo (Figura 12B). Inoltre, analisi di vitalità condotte mediante saggio MTT evidenziano che nelle cellule silenziate per SPARC la riduzione della vitalità cellulare indotta dal trattamento combinato è soltanto del 25% rispetto all'80% osservato nelle cellule non silenziate (Figura 12C).



**Figura 12. Effetti del silenziamento della proteina SPARC in cellule MG63.** (A) Valutazione, tramite analisi di western blotting, dei livelli di espressione della proteina SPARC in cellule MG63 silenziate per SPARC e trattate con la combinazione WIN/TRAIL. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento. (B) Valutazione degli effetti morfologici indotti dal trattamento con WIN, TRAIL e la loro associazione in cellule MG63 silenziate per SPARC. (C) Saggio di vitalità cellulare in cellule MG63 silenziate per SPARC e trattate con l'associazione WIN/TRAIL per 24 ore.

## L'incremento dei livelli di SPARC è correlato all'induzione di ER stress e autofagia dipendenti da WIN

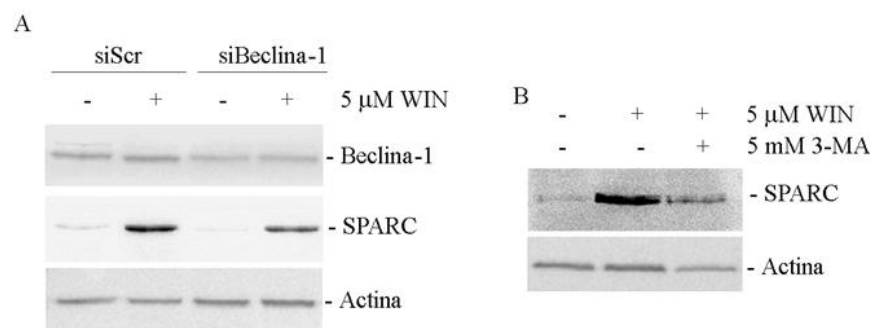
Al fine di verificare l'esistenza di una correlazione tra ER stress e SPARC nel nostro modello sperimentale, abbiamo analizzato i livelli di CHOP, il principale marker di ER stress, nelle cellule silenziate per SPARC e trattate con WIN. Come mostrato in Figura 13A, l'incremento nei livelli di CHOP indotto dal WIN non è stato modificato dal silenziamento di SPARC. E' interessante invece l'osservazione che l'incremento di SPARC WIN-dipendente potrebbe non essere una conseguenza dell'attivazione dell'evento di stress del reticolo ma piuttosto una conseguenza dell'incremento del fattore trascrizionale CHOP. Infatti, al contrario di quanto riportato in letteratura [54], il silenziamento di CHOP, che abbatta quasi del tutto i livelli basali della proteina, riduce marcatamente l'incremento di SPARC indotto dal WIN (Figura 13B). Ulteriore conferma della dipendenza di SPARC da CHOP è data dal fatto che in cellule silenziate per GRP78 e trattate con WIN non si ha alcuna variazione dei livelli della proteina SPARC, rispetto alle cellule non silenziate (Figura 13C). Questi risultati ci fanno ipotizzare che l'aumento trascrizionale del messaggero di SPARC possa dipendere direttamente dall'attivazione del fattore trascrizionale CHOP.



**Figura 13. L'incremento dell'espressione di SPARC dipende dal fattore trascrizionale CHOP.** (A) Valutazione dei livelli di CHOP in cellule MG63 silenziate per SPARC. Valutazione dei livelli di SPARC in cellule MG63 silenziate rispettivamente per CHOP (B) o GRP78 (C). Dopo il trattamento con 5 μM WIN per 24 ore i lisati cellulari di cellule silenziate e controllo sono stati analizzati attraverso immunoblotting usando anticorpi specifici per le proteine di interesse come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

Inoltre, lo studio della relazione tra SPARC e il processo autofagico ha evidenziato la riduzione dei livelli di SPARC sia nelle cellule MG63 silenziate per la beclina-1, principale marker degli autofagosomi, che in quelle trattate con la 3MA, principale

inibitore delle fasi precoci dell'autofagia (Figura 14), indicando così che l'incremento dei livelli di SPARC è conseguenza sia dell'induzione di ER stress che di autofagia dati dal trattamento con WIN.



**Figura 14. L'espressione di SPARC è correlata all'evento autofagico.** (A) Valutazione dei livelli di SPARC in cellule MG63 silenziate per Beclina-1. (B) Valutazione dei livelli di SPARC in cellule MG63 trattate con 5  $\mu$ M WIN e 5 mM 3-MA per 24 ore. I lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

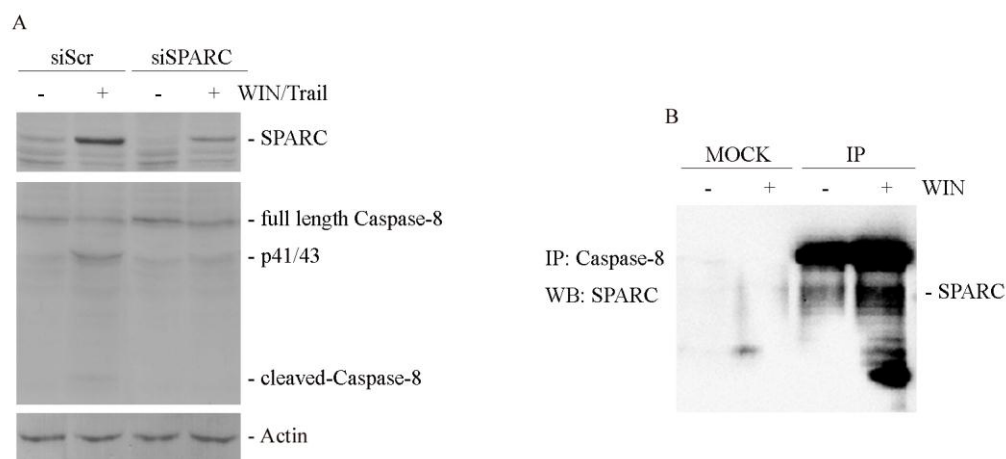
### L'interazione SPARC/caspasi-8 media il pathway apoptotico estrinseco

I dati ottenuti ci hanno quindi fatto ipotizzare un ruolo critico di SPARC nell'induzione di morte spingendoci a cercare la modalità responsabile della sensibilizzazione a TRAIL. In alcuni modelli sperimentali SPARC media l'induzione di apoptosi in maniera caspasi 8-dipendente interagendo con essa e portandola a ridosso dei recettori di morte [55]. Essendo la caspasi-8 una proteasi iniziatrice del percorso apoptotico estrinseco, la sua attivazione sembrerebbe altamente plausibile nell'induzione di morte data dal trattamento combinato WIN/TRAIL.

Per capire meglio l'eventuale relazione tra induzione di SPARC e attivazione della caspasi-8, abbiamo analizzato i livelli della proteasi dopo silenziamento di SPARC. Il risultato, riportato in Figura 15A, mostra come le bande corrispondenti alle forme enzimatiche attive non siano presenti quando la proteina SPARC è silenziata, dimostrando una stretta correlazione tra gli alti livelli di SPARC e l'attività della caspasi-8.

Inoltre, a conferma della possibile interazione tra SPARC e caspasi-8 abbiamo effettuato esperimenti di co-immunoprecipitazione. I lisati di cellule controllo e trattate con WIN per 24 ore sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-caspasi-8 ed è

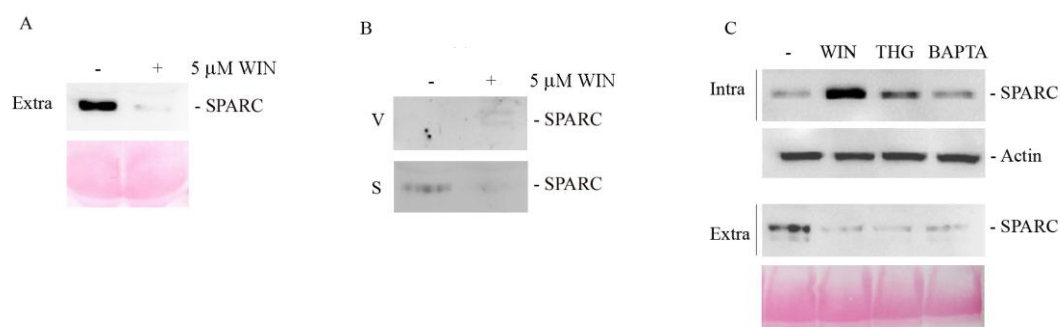
stata valutata la presenza di SPARC nell'immunoprecipitato. I risultati, riportati in Figura 15B, mostrano un aumento dei livelli di SPARC nell'immunoprecipitato facendoci ipotizzare che, anche nel nostro modello sperimentale, la pro-caspasi-8 potrebbe interagire con SPARC che la trasporta e la stabilizza a ridosso del microdominio di membrana in cui GRP78 agisce come recettore di TRAIL.



**Figura 15. SPARC media la sensibilizzazione a TRAIL mediante legame con la caspasi-8.** (A) Valutazione dei livelli della procaspasi-8 e dei suoi frammenti attivi in cellule MG63 silenziate per SPARC. Dopo il trattamento con la combinazione WIN/TRAIL i lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting usando anticorpi specifici per le proteine SPARC e caspasi-8 come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento. (B) Valutazione del legame tra SPARC e caspasi-8 mediante analisi di co-immunoprecipitazione. I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con un anticorpo specifico per la procaspasi-8, mentre per l'immunoblotting è stato utilizzato l'anticorpo specifico per SPARC come riportato in Materiali e Metodi.

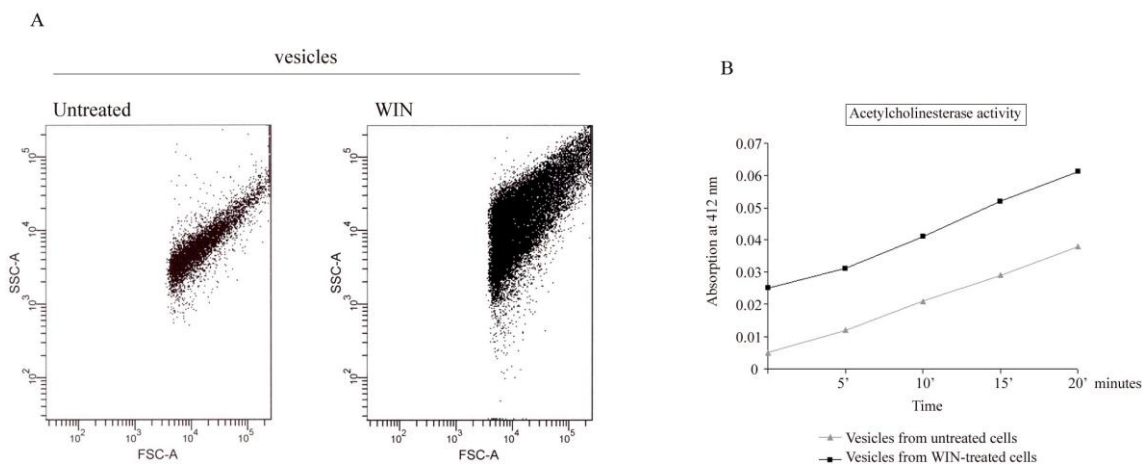
## Il WIN modula anche i livelli extracellulari di SPARC

E' noto dalla letteratura che SPARC esercita differenti ruoli in qualità di glicoproteina matricellulare secreta regolando l'interazione cellula-cellula e cellula-matrice [41]. Per questa ragione abbiamo valutato i livelli della proteina SPARC nei terreni provenienti da cellule controllo o trattate con WIN 5  $\mu$ M per 24 ore. I terreni condizionati sono stati dializzati, liofilizzati ed infine tramite western blotting sono stati valutati i livelli di espressione della proteina. I risultati dell'analisi, riportati in Figura 16A, mostrano che i livelli di SPARC nei terreni sono speculari rispetto a quelli osservati nei lisati cellulari. La proteina è presente, infatti, ad alti livelli nei terreni provenienti da cellule controllo mentre risulta quasi assente in quelli provenienti da cellule trattate con WIN.



**Figura 16. Il WIN determina una ridotta secrezione della proteina SPARC.** (A) Valutazione dei livelli di SPARC nei terreni di cellule MG63 trattate con WIN 5  $\mu$ M per 24 ore. I terreni sono stati dializzati e centrifugati e ne è stato dosato il contenuto proteico. (B) Valutazione dei livelli della proteina SPARC nelle vescicole (pannello superiore) e nei rispettivi surnatanti (pannello inferiore) sia nella condizione controllo che dopo trattamento con 5  $\mu$ M WIN per 24 ore. Valutazione dei livelli della proteina SPARC in lisati di cellule MG63 trattate per 24 ore con 1  $\mu$ M tapsigargina (THG), 5  $\mu$ M BAPTA e 5  $\mu$ M WIN e nei rispettivi terreni. In A, B, C i livelli della proteina SPARC sono stati analizzati per western blotting come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento per i lisati intracellulari, la colorazione con rosso ponceau per i livelli extracellulari delle proteine.

Abbiamo, quindi, studiato la modalità di secrezione della proteina SPARC ipotizzando che il trattamento con il WIN potesse alterarla o inibirla. Poiché studi recenti mostrano che in alcuni modelli sperimentali SPARC viene secreta tramite vescicolazione, abbiamo ricercato la presenza di vescicole nei terreni condizionati per ultracentrifugazione. Le vescicole sono state così isolate e risospese in PBS. La loro quantificazione è stata condotta tramite analisi citofluorimetrica (Figura 17A) e dosando l'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi (Figura 17B). I risultati mostrano che il WIN incrementa di circa 7 volte la produzione di vescicole.



**Figura 17. Il WIN induce un forte incremento della vescicolazione di cellule MG63.** (A) Analisi citofluorimetrica della quantità di vescicole presenti in terreni provenienti da cellule controllo (plot a sinistra) e cellule trattate per 24 ore con WIN (plot a destra). Per effettuare questa analisi i terreni sono stati ultracentrifugati e le vescicole purificate sono state risospese in PBS come riportato in materiali e metodi. (B) Valutazione quantitativa nel tempo dell'attività dell'acetilcolinesterasi. L'analisi è stata effettuata su vescicole purificate da terreni controllo (linea grigia) e terreni di cellule trattate con WIN (linea nera).

In seguito è stato valutato il livello di SPARC contenuto nelle vescicole. I risultati, riportati in Figura 16B, mostrano come in realtà SPARC sia assente all'interno delle vescicole ma presente soltanto nel soprannatante proveniente da colture di cellule non trattate. In più il trattamento con taspigargina e BAPTA, inibitori del pathway classico di secrezione, in cellule controllo riduce notevolmente la presenza di SPARC nei terreni condizionati (Figura 16C), portandoci ad ipotizzare che la modalità di secrezione della proteina SPARC nel nostro modello sperimentale avvenga tramite la via classica e che il trattamento con il cannabinoide possa inibire questa via al fine di aumentare la concentrazione di SPARC a livello intracellulare.

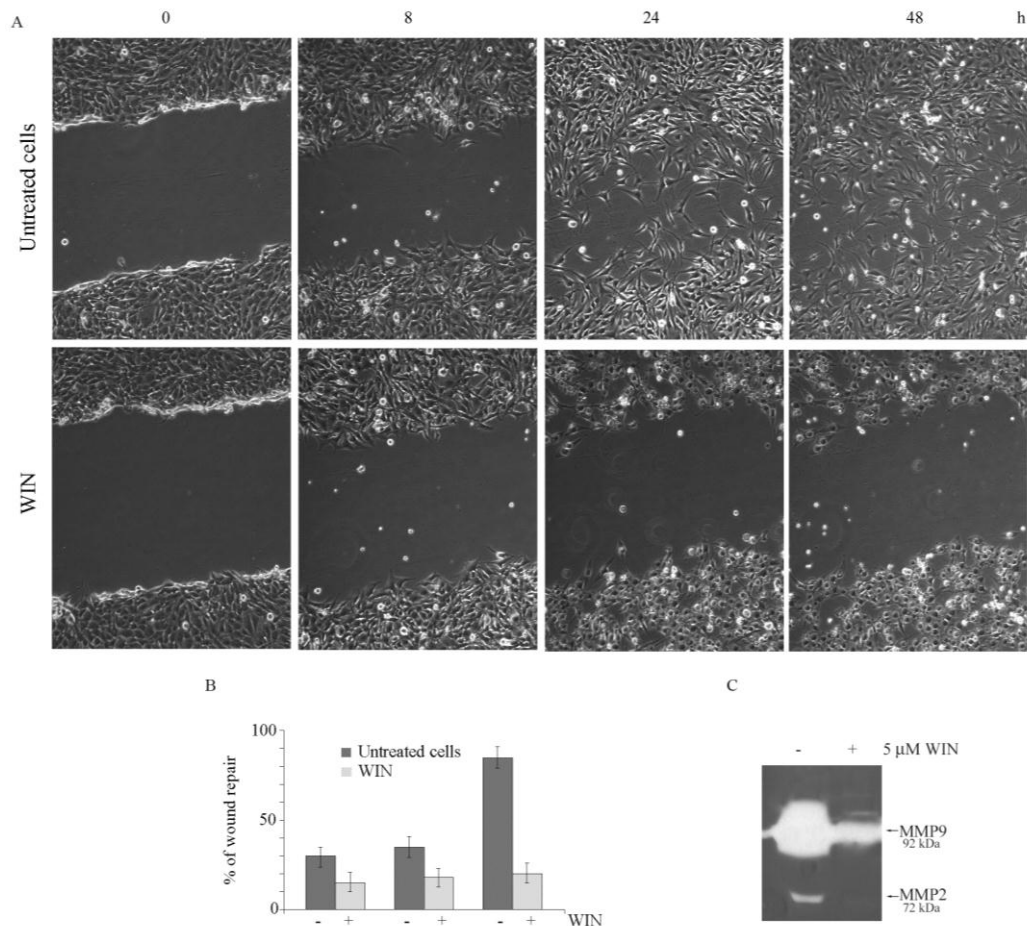
## **Il WIN modula le capacità migratorie delle cellule MG63**

E' stato riportato che i livelli di SPARC nell'ambiente extracellulare possono regolare la migrazione cellulare e l'invasività tumorale. L'osservazione che il trattamento con WIN determina un forte accumulo della proteina a livello intracellulare e una parallela e consistente diminuzione della sua secrezione ci ha indirizzato sullo studio del possibile coinvolgimento di SPARC, e quindi del trattamento con il cannabinoide, nella regolazione del movimento e della migrazione cellulare.

Al fine di valutare in primo luogo se il WIN fosse capace di bloccare la migrazione delle cellule MG63 abbiamo effettuato il saggio del *wound healing*, di routine utilizzato per misurare la capacità delle cellule di migrare e ricoprire la distanza ottenuta dalla distruzione fisica di un monostrato cellulare. I risultati ottenuti hanno mostrato che il WIN decrementa le capacità migratorie delle cellule di osteosarcoma MG63. I dati riportati in Figura 18 mostrano una significativa differenza nella chiusura della ferita e quindi nella capacità migratoria delle cellule trattate con il WIN rispetto alle cellule controllo: dopo 48 ore dal momento in cui è stato effettuato il taglio solo il 20 % delle cellule trattate con WIN sono capaci di migrare nel tentativo di ricoprire la ferita, rispetto alle cellule controllo che hanno quasi del tutto ricoperto l'area vuota (Figura 18A e B).

Al fine di valutare il possibile coinvolgimento delle metalloproteasi 2 e 9 (MMP-2 e -9), due gelatinasi capaci di degradare la matrice extracellulare, nella regolazione della capacità migratoria delle cellule MG63, abbiamo analizzato la loro attività mediante zimografia comparando i surnatanti delle cellule trattate con WIN e delle cellule controllo.

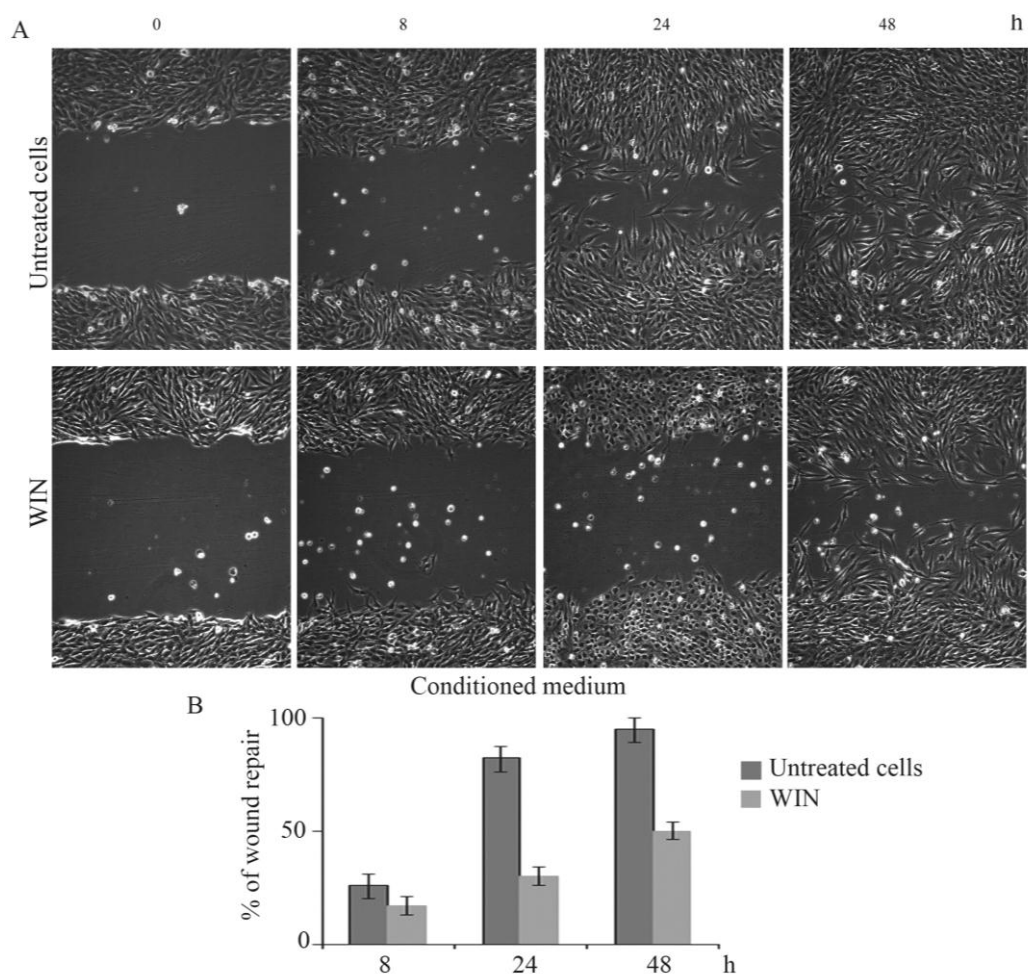
Come mostrato in Figura 18C, l'ampiezza delle bande corrispondenti alle MMP-2 e -9 nel surnatante delle cellule trattate con WIN è considerevolmente ridotta rispetto a quella osservata nella condizione controllo, indicando quindi una minore attività delle MMP in seguito al trattamento con WIN.



**Figura 18. Il WIN regola la migrazione cellulare in cellule MG63** (A) Saggio di *wound healing* in cellule MG63 trattate con WIN 5  $\mu$ M rispetto a cellule controllo. Il taglio è stato effettuato in cellule ad elevata confluenza, come riportato in materiali e metodi. Le foto sono state scattate a 0, 8, 24 e 48 ore dal taglio. L'area di migrazione è stata misurata mediante il software Image J applicando la formula  $T_0 - T_x / T_0$ . (B) Grafico della percentuale di chiusura della ferita. (C) Analisi zimografica dell'attività delle metalloproteasi -2 e -9 in terreni di cellule controllo e cellule trattate per 24 ore con WIN 5  $\mu$ M.

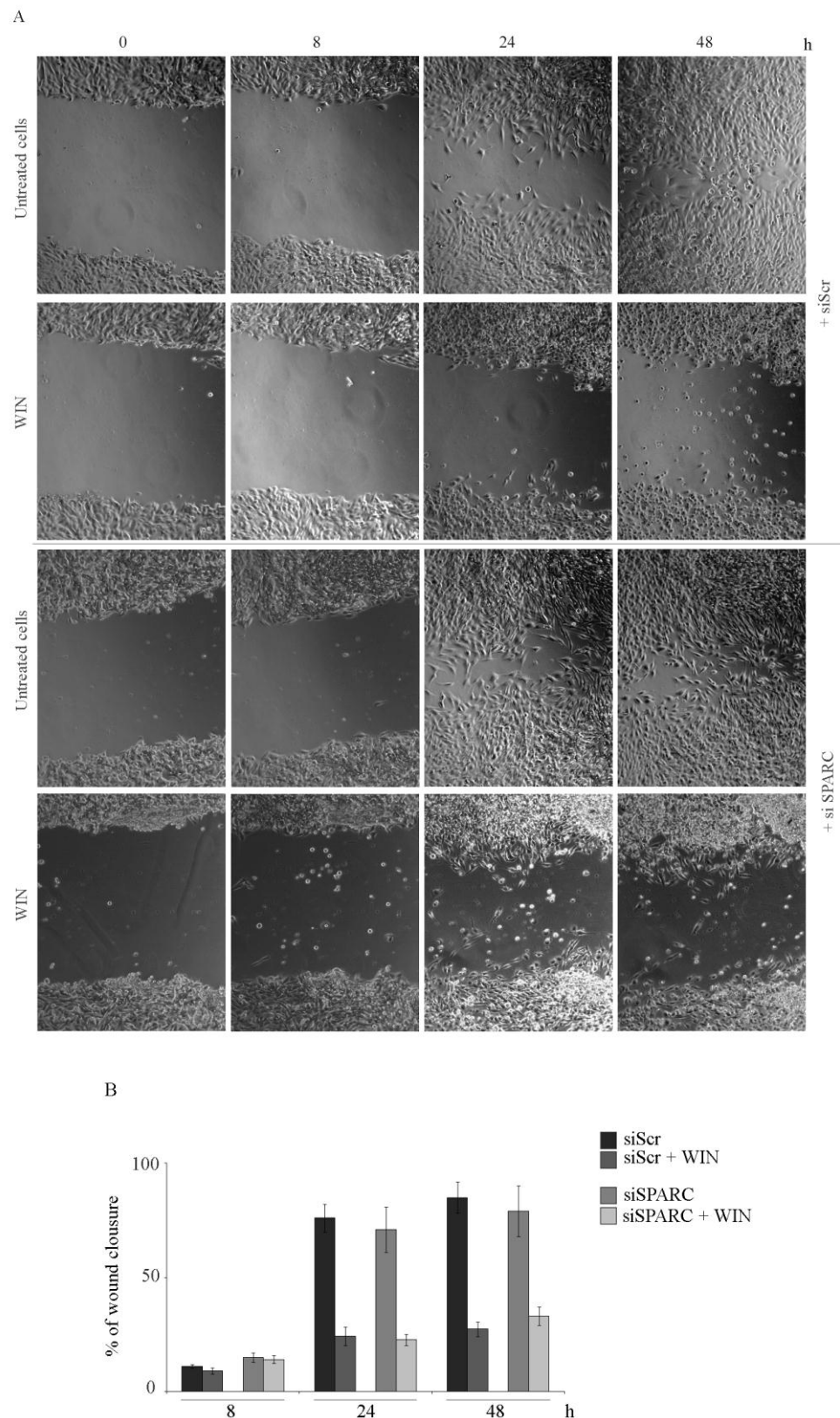
E' interessante notare che l'effetto di blocco della migrazione indotto dal WIN viene parzialmente revertito dall'aggiunta di un terreno condizionato ottenuto da cellule controllo ad alta confluenza (Figura 19).





**Figura 19. I terreni condizionati ripristano la capacità migratoria di cellule trattate con WIN** (A) Saggio di *wound healing* in cellule MG63 trattate con WIN 5  $\mu$ M rispetto a cellule controllo. Il taglio è stato effettuato quando le cellule avevano raggiunto una elevata confluenza cellulare, come riportato in materiali e metodi. Al momento del taglio sono stati aggiunti terreni condizionati provenienti da cellule controllo ad elevata confluenza. Le foto sono state scattate a 0, 8, 24 e 48 ore dal taglio. L'area di migrazione è stata misurata mediante il software Image J applicando la formula  $T_0 - T_x / T_0$ . (B) Grafico della percentuale di chiusura della ferita.

Questi risultati ci hanno portato a ipotizzare che responsabile del blocco della migrazione possa essere qualcosa la cui secrezione è modulata dalla presenza del WIN. Avendo dimostrato che il trattamento con WIN induce un minore rilascio di SPARC nel terreno abbiamo considerato quest'ultimo come possibile mediatore degli effetti sul movimento. Al contrario delle nostre aspettative, però, la ridotta concentrazione extracellulare della proteina SPARC non incide sulle capacità migratorie delle cellule MG63. Come riportato in Figura 20, infatti, esperimenti di *wound healing* condotti in cellule silenziate per SPARC non mostrano alcuna differenza nella percentuale di chiusura dell'area del taglio. Questo risultato ci fa dedurre che nel nostro modello sperimentale SPARC non abbia alcun ruolo sulla migrazione cellulare.



**Figura 20. La proteina SPARC non è coinvolta nella migrazione.** (A) Saggio di *wound healing* in cellule MG63 silenziate per SPARC. Le cellule sono state trasfettate con un siRNA specifico per SPARC come riportato in Materiali e Metodi, come controllo è stato utilizzato un siRNA scramble. Il taglio è stato effettuato quando le cellule avevano raggiunto un'elevata confluenza come riportato in materiali e metodi. Le immagini sono state acquisite a 0, 8, 24 e 48 ore dal taglio. L'area di migrazione è stata misurata mediante il software ImageJ applicando la formula  $T_0 - T_x / T_0$ . (B) Grafico della percentuale di chiusura della ferita.

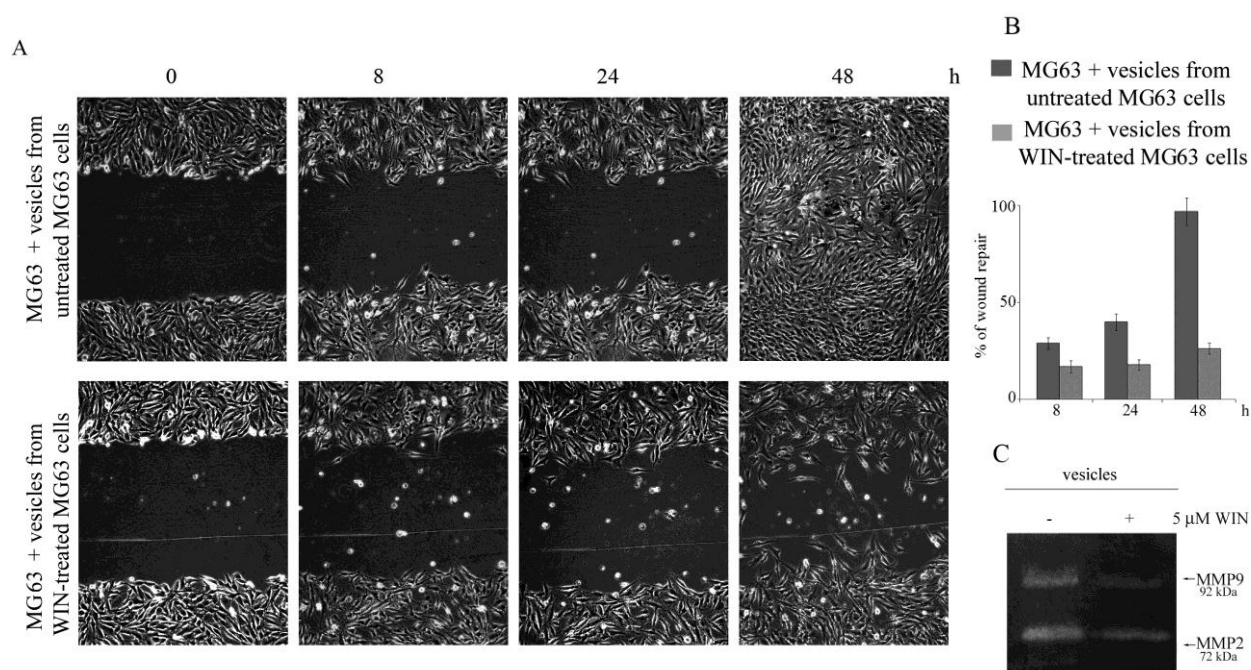
## Le vescicole modulano la migrazione

L'osservazione che il WIN incrementa fortemente il fenomeno della vescicolazione ed il crescente interesse nello studio delle vescicole come mediatori della comunicazione intercellulare, ci ha spinto a valutare il possibile coinvolgimento delle vescicole prodotte in seguito al trattamento con il cannabinoide nel blocco degli eventi migratori.

Abbiamo dunque effettuato esperimenti di wound healing condizionando al momento del taglio le cellule MG63 controllo con vescicole purificate da terreni controllo e terreni provenienti da cellule trattate per 24 ore con 5  $\mu$ M WIN.

La Figura 21A mostra che dopo 48 ore dal taglio mentre le cellule trattate con vescicole controllo chiudono completamente la ferita, le cellule trattate con vescicole provenienti da colture di cellule trattate con WIN chiudono solo parzialmente la ferita mostrando una percentuale di migrazione che mima l'effetto del WIN (Figura 21B).

Inoltre, anche in questo caso, esperimenti di zimografia hanno dimostrato la ridotta attività di MMP-2 e -9 in vescicole purificate da terreni di cellule trattate con WIN, rispetto alla condizione controllo (Figura 21C).

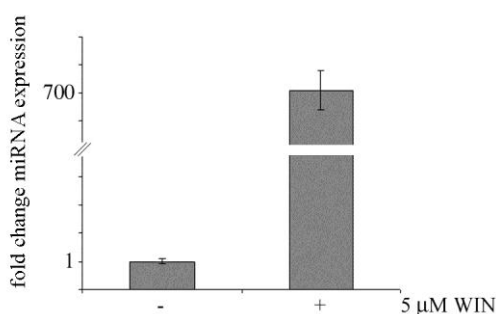


**Figura 21. Le vescicole modulano la capacità migratoria** (A) Saggio di *wound healing* in cellule MG63 incubate con vescicole isolate da terreni condizionati di cellule trattate per 24 ore con 5  $\mu$ M WIN e di cellule controllo. Le vescicole sono state normalizzate per numero ed aggiunte al terreno al momento del taglio. Le foto sono state scattate a 0, 8, 24 e 48 ore dal taglio. L'area di migrazione è stata misurata mediante il software Image J applicando la formula  $T_0 - T_x/T_0$ . (B) Grafico della percentuale di chiusura della ferita. (C) Analisi zimografica dell'attività delle metalloproteasi -2 e -9 condotta su vescicole isolate da colture di cellule controllo e di cellule trattate per 24 ore con 5  $\mu$ M WIN.

### Nelle cellule MG63 SPARC non è un target diretto del miR-29-b1

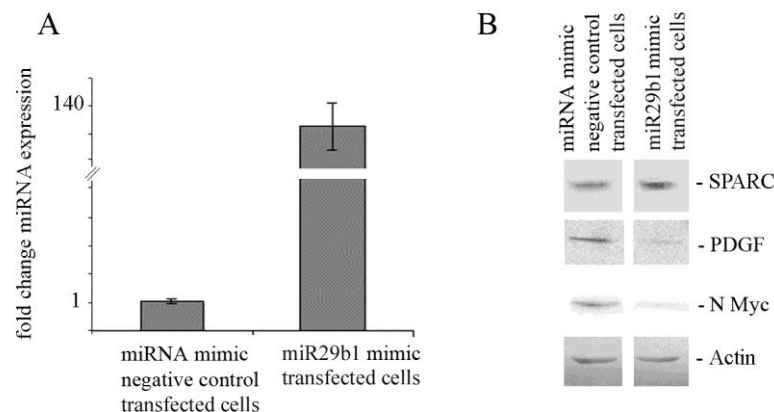
L'ultima fase del progetto ha riguardato lo studio dell'espressione del miR-29-b1, di cui SPARC risulta un target putativo, allo scopo di valutare se l'incremento di SPARC indotto da WIN fosse dovuto non soltanto all'incrementata trascrizione ma anche all'inibizione del suo potenziale regolatore negativo.

Esperimenti di qRT-PCR hanno mostrato che il WIN incrementa i livelli di espressione del miR-29-b1 di circa 700 volte dopo 24 ore di trattamento (Figura 22).



**Figura 22. Il WIN incrementa l'espressione del miR-29-b1.** Valutazione mediante qRT-PCR dei livelli di espressione del miR-29-b1 in cellule MG63 in seguito al trattamento per 24 ore con 5 μM WIN. Per l'esperimento sono stati utilizzati primer specifici per il miR-29-b1 come riportato in materiali e metodi. L'altezza di ciascuna colonna esprime la ratio dell'espressione del miR-29-b1 rispetto ad U6.

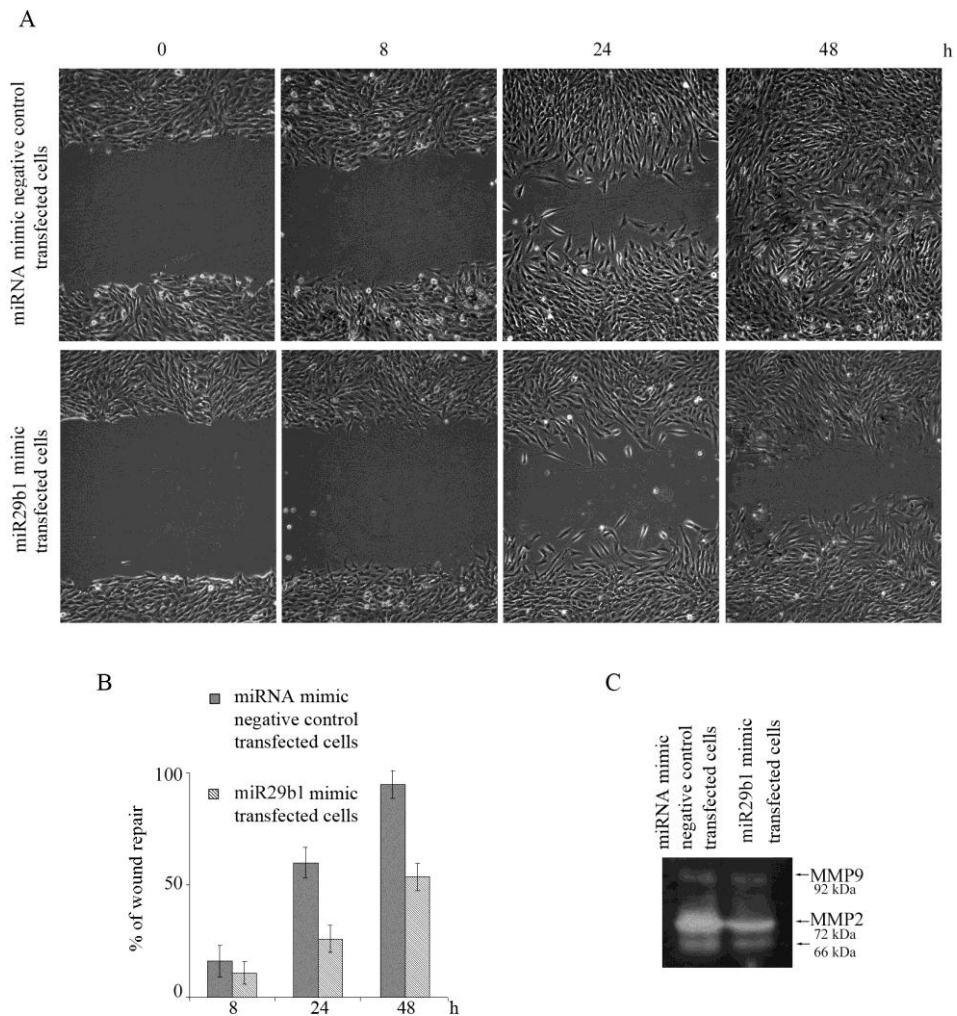
Al fine di validare la nostra ipotesi abbiamo trasfettato in maniera transiente le cellule MG63 con un miR-29-b1 mimic. Dopo aver appurato l'effettiva iperespressione del miRNA mediante real time PCR (Figura 23A) abbiamo valutato in queste cellule, mediante analisi di western blotting, i livelli di espressione di alcuni fattori che risultano essere target putativi del miR-29-b1. La Figura 23B mostra che mentre i livelli della proteina SPARC non variano nelle cellule trasfettate con miR-29-b1 mimic rispetto alle cellule trasfettate con il relativo controllo negativo, i livelli di espressione di PDGF ed N-Myc, altri due target putativi del miR-29-b1, si riducono sensibilmente.



**Figura 23. Valutazione dei livelli di espressione del miR29-b-1 in cellule MG63 overesprimenti miR-29-b1 mimic.** (A) qRT-PCR dei livelli di espressione del miR29-b-1 in cellule MG63 trasfettate in maniera transiente con miR-29-b1 mimic rispetto alle cellule trasfettate con mimic controllo negativo. Per la PCR sono stati utilizzati primer specifici per il miR-29-b1 come riportato in materiali e metodi. Il risultato è stato riportato in scala lineare. L'altezza di ciascuna colonna esprime la ratio dell'espressione del miR-29-b1 rispetto ad U6. (B) Valutazione mediante analisi di western blotting di SPARC, PDGF e N Myc in cellule trasfettate con miR-29-b1 mimic. I lisati cellulari sono stati analizzati attraverso immunoblotting usando anticorpi specifici per le proteine come riportato in Materiali e Metodi. Il blot dell'actina è stato riportato come controllo di caricamento.

### Il miR-29-b1 media l'inibizione della capacità migratoria indotta dal WIN

Molti studi mostrano il coinvolgimento della famiglia miR-29 nella inibizione della migrazione di cellule tumorali esplicando, pertanto il ruolo di *tumor suppressor* attraverso tale modalità. Per verificare tale ipotesi nel nostro modello sperimentale, sono stati effettuati esperimenti di *wound healing* in cellule trasfettate transientemente con il miR-29-b1 mimic. I dati riportati in Figura 24A e B mostrano che le cellule trasfettate hanno una percentuale di chiusura della ferita, e quindi di migrazione, ridotta del 40% rispetto alle cellule trasfettate con il miRNA controllo. Inoltre le cellule trasfettate con il miR-29-b1 mimic mostrano una minore attività delle metalloproteinasi -2 e -9, mimando parzialmente l'effetto del solo WIN (Figura 24C).



**Figura 24. Cellule MG63 overesprimenti il miR-29-b1 mostrano una ridotta capacità migratoria.** (A) Saggio di *wound healing* in cellule MG63 trasfettate transientemente con il miR-29-b1 mimic. Il taglio è stato effettuato quando le cellule avevano raggiunto un'elevata confluenza come riportato in materiali e metodi. Le immagini sono state acquisite a 0, 8, 24 e 48 ore dal taglio. L'area di migrazione è stata misurata mediante il software ImageJ applicando la formula  $T_0 - T_x/T_0$ . (B) Grafico della percentuale di chiusura della ferita. (C) Analisi zimografica dell'attività delle gelatinasi MMP -2 e -9 effettuata in terreni provenienti da cellule che overesprimono il miR-29-b1 e cellule trasfettate con il controllo negativo.

## *Discussione*

Negli ultimi anni la ricerca di farmaci in grado di bloccare la crescita tumorale si è indirizzata verso l'utilizzo di composti ad azione antitumorale, e fra questi crescente interesse è stato rivolto ai cannabinoidi, che in molti modelli sperimentali hanno dimostrato una buona capacità antiproliferativa. Ad oggi, pertanto, l'identificazione del loro meccanismo d'azione assume un'importanza strategica per un loro possibile impiego.

In questo studio, svolto durante il triennio di Dottorato di Ricerca in Biomedicina e Neuroscienze, indirizzo Oncobiologia Sperimentale, ho valutato gli effetti del cannabinoide sintetico WIN55,212-2 sulla linea tumorale di osteosarcoma umano MG63.

Nella prima parte di questo progetto abbiamo analizzato gli effetti dei cannabinoidi anandamide, metanandamide e WIN sulla vitalità cellulare. E' stato possibile dimostrare che tra i cannabinoidi testati, soltanto il WIN è in grado di determinare una riduzione del numero cellulare e chiari effetti morfologici che, comunque, non si accompagnano a morte cellulare. E' stato interessante verificare che il WIN induce aberranti modifiche morfologiche, quali vacuolizzazione citoplasmatica già visibile al microscopio a luce diretta. Questo evento, che è calcio-dipendente, può originare da organelli intracellulari come reticolo endoplasmatico, endosomi o lisosomi e può essere interpretato come una fase specifica dell'autofagia indotta dai cannabinoidi.

Wasik *et al* hanno dimostrato che in cellule di linfoma il WIN induce vacuolizzazione citoplasmatica che origina da stress del reticolo e conduce a morte programmata di tipo III [110]. L'incremento dei livelli di CHOP, TRB3 e GRP78 osservato in cellule MG63 trattate con WIN suggerisce il ruolo dell'ER stress e del calcio nella vacuolizzazione citoplasmatica, come confermato dal silenziamento di CHOP o dall'utilizzo del BAPTA come chelante del  $\text{Ca}^{2+}$  che contrastano la formazione delle strutture vacuolari indotte dal WIN.

Frequentemente, l'ER stress è correlato all'autofagia [27]. In relazione al contesto cellulare, l'autofagia può contrastare l'induzione di stress reticolare al fine di preservare le cellule e indurre sopravvivenza oppure, al contrario, può promuovere la morte cellulare. I risultati da noi ottenuti hanno evidenziato che accanto all'induzione di ER stress si verifica l'attivazione del pathway autofagico, caratterizzato dall'incremento dei livelli di LC3-II e dalla comparsa e accumulo di organelli vescicolari acidi. Inoltre, l'osservazione che i livelli della proteina p62, marker della degradazione autofagica,



decrementano dopo lunghi periodi di trattamento con WIN suggerisce il completamento del processo autofagico.

Tuttavia, in questa linea cellulare il trattamento con WIN non è in grado di indurre morte cellulare. Solo l'aggiunta di basse dosi di TRAIL alle cellule trattate con WIN è in grado di ridurre la vitalità cellulare di circa l'80% rispetto alle cellule controllo. Questo evento di morte è associato, sia morfologicamente che biochimicamente, all'attivazione di un pathway apoptotico classico come confermato dall'impiego dell'inibitore delle attività caspasiche z-VAD. E' importante inoltre mettere in evidenza che l'aggiunta di TRAIL alle cellule trattate con altri cannabinoidi (anandamide e metanandamide) non è stata in grado di modificare gli effetti esercitati dai soli cannabinoidi.

Dopo aver stabilito che la sensibilizzazione a TRAIL è legata all'azione del WIN, abbiamo identificato il tumor suppressor PAR-4 come probabile mediatore di questa sensibilizzazione. La proteina PAR-4 è stata inizialmente identificata come soppressore tumorale in cellule di tumore alla prostata, e ad essa è stata ascritta la capacità di indurre apoptosi, sia tramite pathway estrinseco che intrinseco, selettivamente in cellule cancerose. In un elegante lavoro, Burikanov et al hanno proposto un nuovo *loop* regolatore che vede la traslocazione di GRP78 sulla superficie cellulare mediata dal legame con la quota intracellulare di PAR-4, correlando così l'ER stress all'attivazione del pathway apoptotico estrinseco [108].

Nel nostro modello sperimentale abbiamo osservato un marcato incremento di PAR-4 in seguito al trattamento con WIN e WIN/TRAIL, ma non in seguito al trattamento con il solo TRAIL, suggerendo che l'incremento di PAR-4 è correlato all'ER stress indotto dal WIN, come confermato dalla sua riduzione nelle cellule silenziate per CHOP. Il concomitante incremento di GRP78 sulla superficie cellulare, potrebbe essere, pertanto, una conseguenza della sua traslocazione mediata da PAR-4. Giunto sulla membrana GRP78 fungerebbe da recettore sia per lo stesso PAR-4 secreto che per altri ligandi, come TRAIL, in grado di attivare il pathway estrinseco dell'apoptosi.

Nel tentativo di delineare ancor meglio il pathway indotto dal WIN responsabile della sensibilizzazione all'azione della citochina TRAIL, abbiamo incentrato la nostra attenzione su SPARC, proteina nota anche come osteonectina o BM40, coinvolta nei processi di osteogenesi e nota per il suo ruolo ambiguo nella tumorigenesi. Dati bibliografici riportano la stretta correlazione tra la proteina SPARC e lo stress del reticolo endoplasmatico e dall'altro il suo ruolo di *tumor suppressor* in relazione alla

sua capacità di legare la caspasi-8 e mediarne la traslocazione e attivazione a ridosso della membrana.

Nel nostro modello sperimentale il WIN è capace di determinare un fortissimo incremento tempo-dipendente della proteina SPARC, confermato sia da esperimenti di western blotting che di RT-PCR. L'incremento potrebbe non essere correlato all'induzione di stress reticolare come evento *tout court*, ma alla specifica attivazione del fattore trascrizionale CHOP, come dimostrato da esperimenti di silenziamento genico. E' riportato in letteratura che SPARC è target predittivo della famiglia del miR-29, in particolare del miR-29-b, e i livelli di espressione di tale proteina sembrano essere inversamente correlati ad essi in alcuni modelli sperimentali. Per tali ragioni abbiamo ipotizzato che l'incremento di SPARC dato dal trattamento con WIN possa essere dovuto non soltanto all'incrementata trascrizione ma anche all'inibizione del suo potenziale regolatore negativo. Tuttavia nel nostro modello sperimentale, al contrario delle nostre aspettative, il trattamento con il WIN non determina un decremento del miR-29-b1 ma piuttosto un incremento di circa 700 volte, come dimostrato da analisi di real time PCR. Inoltre, esperimenti di trasfezione transiente con miR-29-b1 mimic ci hanno permesso di dimostrare che effettivamente la proteina SPARC, pur essendo un target putativo di tale miRNA, in realtà nel nostro modello è presente ad elevati livelli anche nella condizione in cui il miR-29-b1 risulta overespresso, mentre i livelli di espressione di altri due target, PDGF ed N-Myc, si riducono sensibilmente. Dato che il PDGF può essere un regolatore negativo della proteina SPARC, il suo decremento potrebbe spiegare il nesso tra il contemporaneo incremento sia del miR-29-b1 che del suo target putativo SPARC nel nostro modello sperimentale.

Esperimenti di co-immunoprecipitazione ci hanno inoltre permesso di dimostrare che, così come riportato in letteratura, SPARC interagisce nelle cellule di osteosarcoma con la caspasi-8, e la sua presenza è fondamentale per l'attivazione della stessa caspasi, come confermato mediante l'utilizzo di un siRNA specifico per SPARC. Nel meccanismo molecolare indotto dal WIN, SPARC sembra assumere il ruolo centrale di *master regulator*. Nelle cellule silenziate per SPARC, infatti, si ha una riduzione sia degli effetti morfologici indotti dal cannabinoide e, soprattutto, degli effetti di morte indotti dal trattamento combinato WIN/TRAIL con un consistente recupero della vitalità cellulare. Come schematizzato in Figura 25, l'azione combinata di PAR-4 e SPARC, indotta dal WIN, contribuirebbe alla formazione di un microdominio di membrana in cui GRP78, portato da PAR-4, fungerebbe da recettore di TRAIL

permettendo così l'attivazione della caspasi -8, a sua volta presente nel microdominio grazie alla azione di SPARC. Questi eventi potrebbero così essere responsabili della sensibilizzazione a TRAIL.

Accanto agli studi condotti per delineare gli effetti intracellulari indotti dal WIN, durante l'ultima fase di sviluppo del progetto ho valutato gli effetti del cannabinoide nell'ambiente extracellulare, analizzando inizialmente gli effetti sulla migrazione cellulare e sulla produzione di vescicole extracellulari.

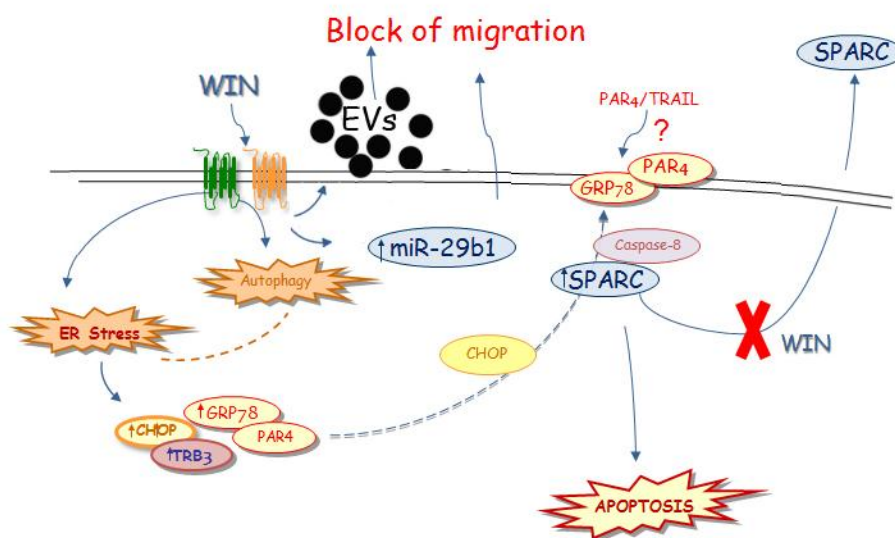
Esperimenti di *wound healing* hanno dimostrato che il WIN è in grado di arrestare la migrazione delle cellule MG63, effetto che si accompagna a una minore attività delle metalloproteinasi (MMP) -2 e -9 e a una riduzione dei livelli di SPARC nell'ambiente extracellulare. La nostra ipotesi, pertanto, è che WIN possa bloccare la secrezione di SPARC e questo contribuirebbe, da un lato, al suo accumulo all'interno della cellula e dall'altro alla riduzione della sua presenza nell'ambiente extracellulare. Il silenziamento dell'espressione di SPARC, contrariamente a quanto da noi ipotizzato, non è stato, però, in cellule controllo non è in grado di modulare in alcun modo le capacità migratorie delle cellule MG63, facendoci dedurre che SPARC non sia coinvolta nei processi migratori.

Pertanto, poiché dati riportati in letteratura mostrano che il miR-29-b1 in molti modelli sperimentali tumorali può agire da regolatore negativo dei processi migratori e invasivi, dato il fortissimo incremento indotto dal WIN di tale miRNA, ne abbiamo studiato il possibile coinvolgimento in tali eventi. I nostri dati mostrano che gli effetti inibitori sulla migrazione indotti dal WIN vengono parzialmente mimati in cellule trasfettate con il miR-29b1 mimic. In più anche nei terreni condizionati provenienti da tali cellule si osserva una ridotta attività delle MMP -2 e -9.

Un altro preliminare risultato indica che il trattamento con il cannabinoide sintetico WIN è in grado di determinare in cellule MG63 anche un fortissimo incremento nel rilascio di vescicole extracellulari. Inoltre, esperimenti di *wound healing* condotti condizionando al momento del taglio le cellule MG63 controllo con vescicole isolate da terreni di cellule trattate con WIN, dimostrano che in tali condizioni sperimentali si ha un blocco della migrazione paragonabile a quello osservato in seguito al trattamento con il cannabinoide.

Pertanto come illustrato in Figura 25, il WIN ha degli effetti anche nell'ambiente extracellulare inibendo fortemente la capacità migratoria di tali cellule. Questi effetti,

però, non sono legati alla riduzione dei livelli extracellulari di SPARC ma sarebbero mediati, probabilmente, dalla iperespressione del miR-29-b1 e/o dall'incremento del numero delle vescicole extracellulari o dalla differente composizione del loro cargo.



**Figura 25.** Schema che riassume il meccanismo d'azione indotto dal cannabinoide sintetico WIN in cellule di osteosarcoma umano MG63.

Sebbene alcuni risultati riportati in questa tesi siano ulteriormente da approfondire, noi riteniamo che i dati diano un importante contributo allo studio del meccanismo d'azione dei cannabinoidi e al loro potenziale antitumorale, fornendo, per la prima volta, nuove indicazioni su specifici aspetti degli effetti dei cannabinoidi nell'ambiente extracellulare.

## ***Bibliografia***

1. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the CB receptor*. Science 258:1946-1949.
2. Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) *Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptor*. Prog Lip Res 45: 405-446.
3. Astarita G, Ahmed F, Piomelli D (2008) *Identification of biosynthetic precursors for the endocannabinoid anandamide in the rat brain*. J Lipid Res 49:48-57.
4. Fine PG, Rosenfeld MJ (2013) *The endocannabinoid system, cannabinoids, and pain*. Rambam Maimonides Med J. 4(4):e0022. doi: 10.5041/RMMJ.10129.
5. Compton DR, Gold LH, Ward ST, Balster RL, Martin BR (1992) *Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of class of compounds structurally distinct from THC*. Journal of Pharmacol Exp Ther 263:1118-1126.
6. Bird KD, Boleyn T, Chesher GB, Jackson DM, Starmer GA, Teo RKC (1980) *Inter-cannabinoid and cannabinoid-ethanol interactions and their effects on human performance*. Psychopharmacology 71:181-188.
7. Chávez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010) *TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus*. Nat Neurosci. 13:1511-8.
8. Demuth DG, Molleman A (2006) *Cannabinoid signalling*. Life Sci 78: 549-563.
9. Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Haro A, Guzmán M (2005) *Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand*. Life Sci. 77:1723-31.
10. Pertwee RG (2002) *Cannabinoids and multiple sclerosis*. Pharmacol Ther. 95:165-74.
11. White AC, Munson JA, Munson AE, Carchman RA (1976) *Effects of delta9-tetrahydrocannabinol in Lewis lung adenocarcinoma cells in tissue culture*. J Natl Cancer Inst. 56:655-8.
12. Guzmán M (2003) *Cannabinoids: potential anticancer agents*. Nat Rev Cancer 3:745-755.
13. Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J (2006) *Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma*. Mol Pharmacol 70:1612-20.
14. Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H (2006) *Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest*. J Biol Chem 281:39480-91.
15. Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K (2006) *Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma*. J Pharmacol Exp Ther 318:1375-87.
16. Carracedo A, Gironella M, Lorente M (2006) *Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes*. Cancer Res 66:6748-55.
17. Freimuth N, Ramer R, Hinz B (2010) *Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis*. J Pharmacol Exp Ther 332:336-344.
18. Calvaruso G, Pellerito O, Notaro A, Giuliano M (2012) *Cannabinoid-associated cell death mechanisms in tumor models (review)*. Int J Oncol. 41:407-13.

19. Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, Costa B, Macchi P and Parolaro D (2006) *The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells*. Cell Mol Life Sci 63:2057-2066.
20. McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2006) *Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: a novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression*. Mol Pharmacol 70: 897-908.
21. Malhotra JD and Kaufman RJ (2007) *Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?* Antioxid Redox Signal 9: 2277-2293.
22. Pellerito O, Calvaruso G, Portanova P, De Blasio A, Santulli A, Vento R, Tesoriere G and Giuliano M (2010) *The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- induced apoptosis by activating p8/CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (CHOP)/death receptor 5 (DR5) axis*. Mol Pharmacol 77: 854-863.
23. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M (2000) *Anti tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation*. Nat Med 6:313-319.
24. Luca T, Di Benedetto G, Scuderi MR, Palumbo M, Clementi S, Bernardini R, Cantarella G (2009) *The CB1/CB2 receptor agonist WIN-55,212-2 reduces viability of human Kaposi's sarcoma cells in vitro*. Eur J Pharmacol 616: 16-21.
25. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) *Akt signalling in health and disease*. Cell Signal 23: 1515-1527.
26. Park JM, Xian XS, Choi MG, Park H, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Chung IS (2011) *Antiproliferative mechanism of a cannabinoid agonist by cell cycle arrest in human gastric cancer cells*. J Cell Biochem 112: 1192-1205.
27. Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S (2009) *Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells*. J Clin Invest 119: 1359-1372.
28. Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N , Guzmán M, Velasco G, Díaz-Laviada I (2011) *Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy*. Cell Death Differ 18: 1099-1111.
29. Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A (2011) *Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy*. Mol Cancer Ther 10:1161-1172.
30. Donadelli M, Dando I, Zaniboni T, Costanzo C, Dalla Pozza E , Scupoli MT, Scarpa A, Zappavigna S, Marra M, Abbruzzese A, *et al* (2011) *Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism*. Cell Death Dis 2: e152.
31. Gustafsson SB, Lindgren T, Jonsson M and Jacobsson SO (2009) *Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal carcinoma cells: synergism with 5-fluorouracil*. Cancer Chemother Pharmacol 63: 691-701.
32. Ottaviani G. Jaffe N. (2009) *The etiology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res. 152: 15-32
33. Hansen MF. (1991) *Molecular genetic considerations in osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res. 270: 237-46

34. Kansara M, Thomas DM. (2007) *Molecular pathogenesis of osteosarcoma*. DNA and Cell Biology. 26:1–18.
35. Eliceiri BP (2001) *Integrin and growth factor receptor crosstalk*. Circ Res 89:1104–1110
36. Porter JC, Hogg N (1998) *Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors*. Trends Cell Biol 8:390–396.
37. Farrow B, Albo D, Berger DH. (2008) *The role of the tumor microenvironment in the progression of pancreatic cancer*. J Surg Res 149:319–328.
38. Bornstein P, Sage, EH (2002) *Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function*. Curr. Opin. Cell Biol. 14, 608–616.
39. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. (2006) *The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling*. Curr Opin Cell Biol 18:463–471.
40. Timothy F. Lane, E Helene Sage (1994) *The biology of Sparc a protein that modulates cell-matrix interactions*. Faseb J 8: 163-73.
41. Brekken RA, Sage EH. (2001) *Sparc a matricellular protein: a crossroad of cell-matrix communication*. Med Sci Monit 13: 25-30.
42. Kos K, Wilding JP. (2010) *SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes*. Nat Rev Endocrinol. 6:225-35.
43. Sage E.H., Bornstein P (1991) *Extracellular proteins that modulate cell–matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin*. J. Biol. Chem 266:14831–14834.
44. Sage EH, Yan (1999) *Sparc, a matricellular glycoprotein with important biological functions*. J Histochem Cytochem 47:1495-506.
45. Bradshaw A, Sage H (2001) *Sparc, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury*. J Clin Invest 107:1049–1054.
46. Sage H, Vernon RB, Funk SE, Everitt EA, Angello J (1989) *SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to the extracellular matrix*. J Cell Biol 109:341–356.
47. Barker TH, Baneyx G, Cardo-Vila M, Workman GA, Weaver M, Menon PM et al. (2005) *SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity*. J Biol Chem 280:36483–36493.
48. Weaver MS, Workman G, Sage EH (2008) *The copper binding domain of SPARC mediates cell survival in vitro via interaction with integrin beta1 and activation of integrin-linked kinase*. J Biol Chem 283:22826–37.
49. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. (2010) *Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*. Exp Cell Res. 316: 1271-81.
50. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. (2006) *The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling*. Curr Opin Cell Biol 18:463–471.
51. Zhang JL, Chen GW, Liu YC, Wang PY, Wang X, Wan YL, Zhu J, Gao HQ, Yin J, Wang W, Tian ML. (2012) *Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) suppresses angiogenesis by down-regulating the expression of VEGF and MMP-7 in gastric cancer*. PLoS One. 7: e44618.



52. Mao Z, Ma X, Fan X, Cui L, Zhu T, Qu J, Zhang J, Wang X (2014) *Secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human pancreatic cancer cells with G1 arrest induction*. Tumor Biol. 10:10185-93.
53. Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M et al. (2010) *Cathepsin B facilitates autophagy-mediated apoptosis in SPARC overexpressed primitive neuroectodermal tumor cells*. Cell Death Differ. 17:1529-39.
54. Sailaja GS, Bhoopathi P, Gorantla B, Chetty C, Gogineni V, Velpula K, Gondi C, Rao J. (2013) *The secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces endoplasmic reticulum stress leading to autophagy-mediated apoptosis in neuroblastoma*. Int. J. Oncol 42: 188-196.
55. Tang MJ, Tai IT (2007) *A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers*. J. Biol. Chem. 282: 34457–467.
56. Tai IT, Tang MJ (2008) *SPARC in cancer biology: Its role in cancer progression and potential for therapy*. Drug Res Updates 11 231–246.
57. Shi Q, Bao S, Maxwell JA, Reese ED, Friedman HS, Bigner DD, Wang XF, Rich JN (2004) *Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation*. J. Biol. Chem. 279: 52200–209.
58. Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T (2010) *Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G arrest induction*. Cancer Sci. 101:913-9.
59. Bellahcene A, Castronovo V (1995) *Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer*. Am. J. Pathol. 146: 95–100
60. Yin J, Chen G, Liu Y et al. (2010) *Downregulation of SPARC expression decreases gastric cancer cellular invasion and survival*. J Exp Clin Cancer Res. 29:59.
61. Yiu GK, Chan WY, Ng SW, Chan PS, Cheung KK, Berkowitz RS, Mok SC (2001). *SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells*. Am. J. Pathol. 159, 609–622.
62. Cheetham S, Tang MJ, Mesak F, Kennecke H, Owen D, Tai IT (2008) *SPARC promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2-deoxycytidine to increase SPARC expression and improve therapy response*. Br. J. Cancer 98, 1810–1819.
63. Puolakkainen PA, Brekken RA, Muneer S, Sage EH (2004) *Enhanced growth of pancreatic tumors in SPARC-null mice is associated with decreased deposition of extracellular matrix and reduced tumor cell apoptosis*. Mol Cancer Res 2:215–224.
64. Yunker CK, Golembieski W, Lemke N, Schultz CR, Cazacu S, Brodie C, Rempel SA (2008) *SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion*. Int J Cancer. 122:2735-43.
65. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell. 75:843-54.
66. Friedman RC, et al. (2009) *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res 19:92-105.
67. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. (2004) *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J 23:4051-60.

68. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kom VN. (2003) *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature 425: 415-9.
69. Kim VN (2004) *MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export*. Trends Cell Biol. 14:156-9.
70. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) *Nuclear export of microRNA precursors*. Science. 303:95-98.
71. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) *Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat.Rev.Genet. 9:102-14.
72. Kong YW., et al. (2012) *microRNAs in cancer management*. Lancet Oncol, 13:249-58.
73. Li M, et al. (2010) *microRNA and cancer*. AAPS J. 12:309-17.
74. Okamura K, et al. (2008) *The regulatory activity of microRNA species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution*. Nat Struct Mol Biol., 15:354-63.
75. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. (2012) *miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma*. Cancer Res 72:1865-1877.
76. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF., Gores GJ (2007) *mir-29 Regulates Mcl-1 Protein Expression and Apoptosis* oncogene 26:6133–6140.
77. Wang C, Gao C, Zhuang J-L, Ding C, Wang Y (2012) *A combined approach identifies three mRNAs that are downregulated by microRNA-29b and promote invasion ability in the breast cancer cell line MCF7*. Cancer Res Clin Oncol 138:2127–2136
78. Grant JL, Fishbein MC, Hong LS; Krysan K, Minna JD, Shay JW, Walser TC, Dubinett SM. (2014) *A novel molecular pathway for Snail-dependent, SPARC-mediated invasion in non-small cell lung cancer pathogenesis*. Cancer Prev Res. 7:150-160.
79. Zhang W, Qian JX, Yi HL., Yang ZD, Wang CF., Chen JY, Wei XZ, Fu Q and Ma H (2012) *The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression*. Mol Biol (Mosk) 46:622-627.
80. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI (2011) *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cell Mol Life Sci. 68:2667-88.
81. Ratajczak J., Wysoczynski M., Hayek F., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak M.Z. (2006) *Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication*”. Leukemia 20:1487-95.
82. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) *Shedding microvesicles: artefacts no more*. Trends Cell Biol. 19:43-51.
83. Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. (2009) *Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer*. Inflamm Res. 58:1-8.
84. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. (1996) *B lymphocytes secrete antigenpresenting vesicles*. J. Exp. Med. 183:1161–1172.
85. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S.(1998) *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. Nat. Med. 4:594–600.

86. Simons M, Raposo G (2009). *Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication*. Curr. Opin. Cell Biol. 21:575–581.
87. Théry C, Ostrowski M, Segura E (2009). *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. Nat. Rev. Immunol. 9:581–593.
88. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) *Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression*. J Cell Sci. 123:1603-11.
89. Raposo G, Stoorvogel W (2013) *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends*. J. Cell Biol. 200:373–383.
90. Taylor DD, Gercel-Taylor C (2008) *MicroRNA signatures of tumor derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecol Oncol. 110:13-21.
91. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P et al. (2002) *Malignant effusions and immunogenic tumour derived exosomes*. Lancet. 360:295-305.
92. Nilsson J, Skog J, Norstrand A, Baranov V et al. (2009) *Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer*. Br J Cancer. 100:1603-7.
93. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, et al (2001) *Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming*. Nat Med.7:297-303.
94. Valadi H, Ekstrom K, Bossios S, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol. 9:654-9.
95. Luo SS, Ishibashi O, Ishikawa T, Katayama A, Mishima T et al. (2009) *Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes*. Biol Reprod. 81:717-29.
96. Dreux M, Garaigorta U, Boyd B, Decembre E et al. (2012) *Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity*. Cell Host Microbe 12:558-70.
97. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH et al. (2008) *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol. 10:1470-6.
98. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB et al. (2012) *Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes*. Blood. 119:756-66.
99. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y et al. (2012) *Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA*. Cell Res. 22:107-26.
100. Pellerito O, Notaro A, Sabella S, De Blasio A, Vento R, Calvaruso G, Giuliano M (2014) *Win induces apoptotic cell death in human colon cancer cells through a block of autophagic flux dependent on PPAR-g down regulation*. Apoptosis 16:1029-42.
101. Cheng CH, Shu KH, Chang HR, Chou MC (2012) *Cyclosporine-induced tubular vacuolization: the role of Bip/Grp78*. Nephron Exp Nephrol.; 122:1-12.
102. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al (2000) *LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing*. Embo J. 19: 5720-8.

103. Fujita N, Itoh T, Omori H, et al. (2008) *The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy*. Mol Biol Cell. 19:2092-100.
104. Ichimura Y, Komatsu M. (2010) *Selective degradation of p62 by autophagy*. Semin Immunopathol. 32:431-6.
105. Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. (1995) *Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles*. Eur J Cell Biol. 66:3-14.
106. Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, et al. (2001) *A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles*. Cancer Res. 61:439-44.
107. Seglen PO, Gordon PB.(1982) *3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci USA 79:1889-92.
108. Burikhanov RK, Zhao Y, Goswami A, et al. (2009) *The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis*. Cell 138:377-88.
109. Ni M, Zhang Y, Lee AS. (2011) *Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting*. Biochem J. 434:181-8.
110. Wasik AM, Almestrand S, Wang X, et al. (2011) *WIN55,212-2 induces cytoplasmic vacuolation in apoptosis-resistant MCL cells*. Cell Death Dis. 2: e225.